



## **Proje Sonuç Raporu**

### **Buğdayda Sorun Olan Septorya Yaprak Lekesi (*Zymoseptoria tritici*) Patojeni'nde Fungal Efektör Adayı Bazı SSP (Small Secreted Protein) Genlerinin Fonksiyonel Analizi**

**Program Kodu: 2515**

**Proje No: 114 O 083**

Proje Yürütücüsü:

**Dr. Fatih ÖLMEZ**

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Mahinur AKKAYA

Prof. Dr. Berna TUNALI

Danışman:

Dr. Jason RUDD

ŞUBAT 2018

ANKARA

## ÖNSÖZ

Septorya Yaprak Lekesi (Telemorph: *Zymoseptoria tritici*) tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de buğdayın önemli yaprak leke hastalıklarındandır. Uygun şartlar oluştuğunda önemli verim kayıplarına neden olabilmektedir.

Tam genom sekans analizlerinin yaygınlaşması ile bu önemli buğday patojeninin genom dizisi çıkartılmış ve fungusun genomundaki fonksiyonel genleri kodlayan olası bölgeler biyoinformatik analizler ile belirlenmiştir. Bu gen havuzu içerisindeki hastalık oluşumu sürecinde rol alan fungal genlerin (efektör genler) belirlenmesi, buğday-Septoria interaksiyonlarının daha iyi anlaşılması ve hastalığa dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesinde yeni stratejilerin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Patojenin genomundaki 200 amino asitten küçük, yüksek oranda Cysteine içeren, hücre arasına salınan efektör adayı bazı genlerin (SSP- Small Secreted Protein) fonksiyonlarını belirlemek amacı ile ele alınan bu proje TÜBİTAK desteğiyle 2014-2018 yılları arasında Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü liderliğinde yürütülmüştür.

Proje çerçevesinde gen silme tekniği kullanılarak fungusun genomundaki 8 adet SSP geninin tamamı başarı ile silinebilmiştir. Elde edilen geni silinmiş izolatların bazı morfolojik ve patojenik özellikleri incelenmiştir.

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLO LİSTESİ .....	iii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	iv
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
3. GEREÇ ve YÖNTEM .....	8
3.1 Gereç .....	8
3.2 Metot .....	8
3.2.1 Nükleik asit izolasyonu ve manipülasyonu.....	8
3.2.2 Gen silme kasetlerinin ve plasmidin klonlama için hazırlanması .....	9
3.2.3 Gen silme kasetlerini içeren plasmidin <i>E. coli</i> 'ye klonlanması .....	11
3.2.4 <i>E. coli</i> transformasyon işleminin doğrulanması .....	11
3.2.5 Gen Silme Kasetlerini İçeren Plasmidlerin <i>Agrobacterium</i> 'a Klonlanması.....	13
3.2.6 SSP Genlerinin <i>Zymoseptoria tritici</i> Genomundan Silinmesi Çalışmaları .....	15
3.3. Geni silinen <i>Z. tritici</i> strainlerinin patojenisitelerinin belirlenmesi .....	17
4. BULGULAR .....	19
4.1 SSP genlerinin <i>Z. tritici</i> genomundan silinmesi .....	19
4.2. Gen Silme İşleminin Fungusun Patojenik Karakterine Etkilerinin Belirlenmesi..	27
5. TARTIŞMA.....	31
KAYNAKLAR .....	35

## TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmada fonksiyonu araştırılan <i>Z. tritici</i> SSP genleri (Amaral ve ark., 2012).....	8
Tablo 2. Fragmentlerin ve vektörün uygun enzimlerle kesiminde kullanılan protokol .....	10
Tablo 3. Uygun enzimlerle kesilen ve temizlenen insert ve plasmid DNA'larına uygulanan ligasyon işleminin detayları .....	10
Tablo 4. Koloni PCR için kullanılan karışımın içeriği .....	12
Tablo 5. Sekanslama işlemi için gerçekleştirilen Cycle Seq PCR karışımının içeriği .....	13
Tablo 6. Hastalık şiddetinin hesaplanmasında kullanılacak skala .....	17
Tablo 7. Gen silme kasetlerinin eldesi için dizayn edilen primer ve enzim kesim bölgelerine ait bilgiler.....	20
Tablo 8. SSP genleri silinmiş izolatların oluşturduğu hastalık şiddeti değerlerine ait varyans analizi.....	29



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1 Silinecek genlerin 5' ve 3' yapışma bölgeleri için primer dizaynı .....	9
Şekil 2. Klonlanan insertlerin pozisyonunu analiz etmek için kullanılan primerlerin dizaynında kullanılan yaklaşım (LF-CF: Left flanking control-forward; LF-CR: Left flanking control-reverse; RF-CF: Left flanking control-forward; RF-CR: Left flanking control-reverse) .....	12
Şekil 3. Sekans analizlerinden bir görüntü .....	13
Şekil 4. Transformasyon sırasında besi yerleri ve tamponların hazırlanması için kullanılan çözeltiler ve filtre sterilizasyonu için hazırlanan Kanamisin ve Hygromisin antibiyotik stokları .....	15
Şekil 5. Gen silme işleminin doğrulanması için primer dizaynı: P-FRW hedef genin dışından dizayn edilen primer, P-RV hedef genin içinden dizayn edilen primer .....	17
Şekil 6. Gen silme işleminin etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan patojenisite testlerinin optimizasyonu çalışmaları .....	18
Şekil 7. Silinecek genlerin 5' ve 3' yapışma bölgelerinin enzim kesim yerleri yönüyle analizi .....	19
Şekil 8. Gen silme kasetlerinin oluşturulması için çoğaltılan gen yapışma bölgeleri. ....	21
Şekil 9. Kompetent <i>E. coli</i> hücrelerine sıcaklık şoku ile plasmid girişinin sağlanması .....	21
Şekil 10. Transformasyon sonrası Kanamisin direnci kazanmış <i>E.coli</i> kolonileri ve koloni PCR için kolonilerin numaralandırılması .....	22
Şekil 11. Transformasyon işlemi tamamlanan 87205 kodlu (Zt1) fungus geninin sağ yapışma (right flanking) bölgesine ait, klonlama işlemini ve klonlamanın pozisyonunu analiz etmek için yapılan koloni PCR sonuçları. Her bant aynı klonlama işleminde gelişen ayrı bir koloniden elde edilmiştir. 988 bp uzunluğundaki sonuçlar fragmentin tam olarak klonlanabildiğini, 496 bp uzunluğundaki fragment ise fragmentin doğru pozisyona klonlandığını göstermektedir. ....	22

Şekil 12. Transforme edilen Agro hücrelerinin inkübasyonu ve gelişen Kan <sup>+</sup> koloniler.....	23
Şekil 13. Zt1 genine ait gen silme kasedinin (Zt1F1+HYG+Zt1F2) Agrobacterium'a transformasyonu işleminin ardından gelişen kolonilerden, sol (F1) ve sağ (F2) yapışma bölgelerinin tam olarak ve doğru pozisyonda klonlandığını gösteren koloni PCR sonucu. ....	23
Şekil 14. Plasmid üzerinde Zt1_F1 fragmentinin konumunun doğruluğu tespit etmek için gerçekleştirilen çakıştırma işleminden bir görüntü. Fragmentin plasmid üzerindeki Kanamycin direnç geni ile Trp Promotör bölgesi arasına başarı ile klonlandığı görülmektedir. ....	24
Şekil 15. Kurutma kağıtları arasında steril edilen selefondiskler ve bu disklerin IM:AS:Kan içeren petri kaplarına yayılması .....	24
Şekil 16. Yoğunlukları daha önceden ayarlanmış <i>Z. tritici</i> ve Agrobacterium kültürlerinin bir araya getirilmesi .....	24
Şekil 17. Bir önceki aşamada hazırlanan karışımın selüloz membran üzerine yayılması ve bu şekilde hazırlanan petrilerin oda sıcaklığında inkübasyonu. ....	25
Şekil 18. . Aspergillus Minimal Medium: Timentin: Hygromisin içeren petrilerde gelişmeye başlayan transforme olmuş <i>Z. tritici</i> kolonileri .....	25
Şekil 19. Transformasyonun doğrulanması için Aspergillus Minimal Medium: Timentin: Hygromisin petrilerinde tekrarlı alt kültüre alınan <i>Z. tritici</i> transformantları .....	26
Şekil 20. Hedef genin silindiği izolatta (mutant) ve kontrol izolatında (wild type) gen silme işleminin doğrulanması. Gen silme işleminin başarı ile gerçekleştiği durumda herhangi bir PCR bandı oluşmamıştır. ....	26
Şekil 21. Patogenisite deneyleri için geliştirilen bitkiler .....	27
Şekil 22. Üç haftalık buğday bitkilerine geni silinmiş izolatların bulaştırılması ....	27
Şekil 23. Bulaştırmanın ardından nem çemberinde inkübasyona bırakılan bitkiler .....	28
Şekil 24. Geni silinmiş izolatlar ile yapılan patogenisite testlerinden görüntü. Sol tarafta Zt1 genine ait denemede tamamen nekroze olmuş bitkiler görünmektedir. Sağ tarafta kontrol bitkileri yer almaktadır. ....	28



Şekil 25. IPO323'ün genomundan silinen Zt3 (104444)'ün silinmesinin ardından Z.tritici koloni morfolojisinde meydana gelen değişimler. Koloni rengi değişmiş ve mikropikniospor oluşumu engellenmiştir. .... 29

## ÖZET

Septorya yaprak leke hastalığı etmeni *Zymoseptoria tritici* ülkemizde buğdayın en önemli yaprak hastalıklarından birisidir. Askomiset, hemibiotrof bir fungus olan fungusun tam genom sekans analizleri tamamlanmış ve erişime açılmıştır. Fungusun genomundaki genlerin fonksiyonlarının ve bitkiyi hastalandırma sürecinde görev alan efektör genlerinin belirlenmesi fungusa karşı mücadele stratejilerinin geliştirilmesinde büyük önem arz etmektedir.

Bu proje buğday yaprak lekesi etmeni *Z. tritici* genomunda yer alan bazı küçük, hücre arasına salınan proteinleri kodlayan, fungal efektör adayı genlerin (Small Secreted Protein- SSP) gen silme tekniği ile fungusun genomundan silinip, fungusun biyolojik ve patolojik özelliklerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Hedef SSP genlerine ait nükleotid dizileri kullanılarak oluşturulan gen silme kasetleri ve *Agrobacterium* temelli transformasyon tekniği kullanılarak patojenin genomundan hedeflenen genlerin tamamı silinebilmiştir.

Silinen SSP genlerinden biri (Zt-3) fungusun temel biyolojik özelliklerinden biri olan maya formunda gelişim özelliğini önemli oranda etkilemiştir. Zt-3 geni silinmiş izolat sadece makro piknidiospor üretebilmiştir. Çalışılan genlerin fungusun hastalandırma yeteneği üzerinde etkili olup olmadığı, geni silinmiş izolatlar ile yapılan patojenisite testleri ile araştırılmıştır. Herhangi bir etki bulunamamıştır.

Çalışma sonunda *Z. tritici* gen fonksiyonu çalışmalarında gen silme tekniği ülkemizde ilk defa kullanılmış ve optimize edilmiştir. Yapılan çalışma bu tekniğin fungal genlerin fonksiyonlarının belirlenmesinde başarılı ve etkin bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuştur.

**Anahtar kelimeler:** Buğday, Yaprak Leke Hastalığı, Fungal Efektör, SSP, Gen Silme

## ABSTRACT

Septoria leaf blotch is one of the most important leaf diseases of wheat in Turkey. Ascomycet and hemibiotrophic fungus was sequenced as whole genome and release in public. It is very important to find out functions of the fungal genes and effector proteins having roles in pathogenicity to develop new management strategies against fungus.

This project was carried out to knock out of some Small Secreted Proteins (SSP) genes and examine the effects of gene deletion process on biological and pathogenic characteristics of it. Target SSP genes were successfully deleted using gene deletion cassettes produced using nucleotide sequences of SSP genes and Agrobacterium mediated transformation.

One of deleted SSP genes (Zt-3) effected to development of yeast form of the fungus in important scale. Mutant isolate could only produce macropicniospores. It was investigated for the selected SSP genes whether gene deletion caused any difference on fungal pathogenicity using plant tests. Results showed there was no effects of deletion of these genes.

At the end of the study, gene deletion technique was firstly optimized and used in gene function studies on *Z. tritici*. This study showed that this technology can be used properly and effectively on gene function studies of the fungi.

**Keywords:** *Wheat, Leaf Blotch Disease, Fungal Effector, SSP, Gene Knockout*

## 1. GİRİŞ

Buğday ülkemizdeki ekilebilir tarım alanlarının yaklaşık %30'unda üretilmekte ve yıllık ortalama 20 milyon ton üretim ile yaklaşık 15 milyon insanımız için geçim kaynağı olmaktadır. Halihazırda günlük kalori ihtiyacımızın çok önemli bir parçası buğdaydan karşılanmaktadır ve buğday bu yönüyle çok stratejik bir üründür.

Buğdayda verim kayıplarına neden olan biyotik ve abiyotik etmenler bulunmaktadır. Özellikle epidemi oluşturmaları durumunda fungal hastalıklardan kaynaklanacak verim kayıpları ülkeler için ciddi ekonomik krizlere neden olabilecek bir potansiyele sahiptir. Bu nedenle de bu etmenlerle kültürel ve kimyasal yöntemler kullanarak mücadele etmek, buğday üretimini stabil tutmak için alınabilecek önlemlerin başında gelmektedir.

Hastalık etmenlerinin yol açtığı zararları azaltmak için öncelikle patojen ile konukçusu arasındaki ilişkiyi iyi analiz etmek, anlamak gerekmektedir. Funguslar konukçusunda var olan bariyerleri alt ederek, onu enfekte edebilmek için birtakım proteinler kullanırlar. Efektör adı verilen bu proteinler konukçudaki dayanıklılık mekanizmalarını aktive eder ya da sustururlar. Bu özelliklerinden dolayı efektörler, pestisitler için de hedef bölge olma potansiyeline sahiptirler. Efektör proteinleri yıkan kimyasalların geliştirilmesi, bir fungusa karşı ilaç geliştirmenin temel basamaklarından biridir.

Efektörler bitki dayanıklılığı olgusunun da çok önemli bir parçasıdır. Efektörlerin konukçusunda baskıladığı ve bitkide hassasiyete neden olan genlerin (susceptibility genes) belirlenmesi bitki dayanıklılık ıslahı için büyük önem arz etmektedir. Zira bu genlerden bitkiyi klasik ya da moleküler ıslah yöntemleri ile arındırmak, bitkiyi o patojene karşı dayanıklı hale getirmektedir. Fungal efektörlerin belirlenmesi, onların dayanıklılık ıslahındaki bu kilit rollerinden dolayı büyük önem taşımaktadır. Tam genom sekans analizlerinin ucuzlaştığı ve yaygınlaştığı son on yıllık süreçte, fungal efektörlerin belirlenmesi için yapılan çalışmalar hız kazanmış farklı organizmalarda birçok efektör protein belirlenmiştir.

Septoria yaprak leke hastalığı tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de buğdayın önemli hastalıklarından birisidir. Orta (Turgay, 2016) ve Güneydoğu Anadolu'da (Ölmez, 2011) yakın zamanda yapılan çalışmalarda hastalığın önemli oranlarda

yaygınlık gösterdiği ortaya konulmuştur. Hastalığa karşı ruhsatlı ve etkili fungusitler olmasına rağmen, en ekonomik ve çevreci yöntem dayanıklı çeşitlerin kullanılmasıdır. Yapılan patojenisite çalışmaları *Z. tritici*'ye karşı buğday genotiplerindeki dayanıklılığın birkaç etkili majör gen tarafından yönetilen “kalitatif dayanıklılık” (Arraiano ve Brown, 2006) ve daha az etkili birçok gen tarafından yönetilen “kantitatif dayanıklılık” olarak iki şekilde oluştuğunu göstermiştir. Bugüne kadar yaklaşık 18 majör dayanıklılık geni ve 167 QTL bölgesi tanımlanmış ve farklı kromozomal lokasyonlarda haritalanmıştır. Genlerin birçoğu hem fide hem olgun dönemde dayanıklılık oluştururken bazıları sadece belirli bir dönemde dayanıklılık sağlamaktadır (Brown vd., 2015).

Septoria hastalığına karşı yapılacak dayanıklılık ıslahı çalışmalarında majör genlerin kullanımı çok etkin ve hızlı sonuçlar verse de patojen tarafından hızla dayanıklılık kırılabilir. Bu nedenle “gen yığma ya da pramitleme” olarak adlandırılan, bir bitkide birden fazla majör genin ya da QTL bölgesinin bir araya getirilmesini sağlayacak yaklaşımlar en doğru olanıdır. Bu çalışmalara başlanabilmesi için öncelikle mevcut patojen popülasyonu hakkında yeterli bilgiye sahip olmak ve hangi dayanıklılık genlerinin kullanılabilir olduğunun belirlenmesi gerekmektedir. Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü (AZMMAE) tarafından yakın zamanda tamamlanan patojenik karakterizasyon çalışmasında, ülkemizin farklı buğday üretim alanlarından toplanan Septoria izolatları kullanılmış ve bu koleksiyondaki izolatların ırk ayırıcı setteki Stb4, Stb6 ve Stb12 genlerini içeren bitkileri ya hiç hastalandıramadığı ya da bu bitkiler üzerinde çok düşük düzeyde hastalık oluşturabildiği ortaya konulmuştur (Turgay, 2016). Bu çalışma, Ülkemizde de patojenin önemli düzeyde varyasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Yine, “gene karşı gen” hipotezini destekler şekilde bazı izolatların belirli bir dayanıklılık genini içeren buğday hatlarını hastalandırıp diğerlerini hastalandıramaması bu izolatlarda spesifik fungal efektörlerin varlığına işaret etmektedir. Bu efektörlerin belirlenmesi ve buradan elde edilecek verinin buğday ıslah programlarına entegrasyonu büyük önem taşımaktadır.

Dayanıklı çeşitlerin ıslahında bitkilerdeki dayanıklılık genlerinin yanında, funguslardaki efektör kodlayan genlerin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Efektörler bitki dayanıklılık mekanizmasını alt ederek, bitkide patojene karşı hassasiyet oluşmasına neden olduklarından, dayanıklılık genlerinin bitkiye aktarılması yanında, hassasiyete sebep olan bu genlerin de bitkiden uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu durum nekrotrofik efektör proteinleri üreten funguslara karşı dayanıklılık ıslahı çalışmalarını daha kompleks bir hale getirmektedir; bu zorlu sürecin ilk adımı da fungal efektörlerin belirlenmesidir.



Çok yakın zamanda yayınlanan bir makalede, *Z. tritici*'nin secretome'u hakkında detaylı bir inceleme yapılmış ve bu fungusta 1369 adet gen ürününün hücre arasına salındığı (secreted proteins) tespit edilmiştir. Yine aynı çalışmada, bu fungusun genomunda fonksiyonu hakkında herhangi bir bilgi bulunmayan 171 adet 200 amino asitten küçük gen olduğu belirtilmiştir (do Amaral vd., 2012) . Bu makalenin ardından, bu genlerin fonksiyonlarının belirlenmesi amacıyla farklı araştırma grupları yoğun bir çaba sarf etmektedirler. Çok yakın bir zamanda Zhong ve araştırma ekibi *Z. tritici*'de genomunda bugüne kadar fonksiyonel olarak da doğrulaması yapılan ilk efektör proteini olan *AvrStb6*'yı klonladıklarını bildirmişlerdir. Bu proteinin küçük, sisteince zengin ve hücre arasında salınan tipik bir SSP proteini olduğunu belirtmişlerdir (Zhong vd., 2017)

Planladığımız bu çalışma ile *Z. tritici* genomunda yer alan 8 adet SSP geninin fungusun hastalandırma yeteneğine olan etkileri ortaya konulmaya çalışılmıştır. Bunu yaparken kullanılan gen silme (gene knock-out) tekniğinin, Ülkemizde ilk defa TAGEM enstitülerine ait laboratuvarlarda optimize edilerek, kullanılabilir hale getirilmiş, tekniğin bu fungusta gen fonksiyonu analizlerinde başarı ile kullanılabileceği gösterilmiştir.



## 2. LİTERATÜR ÖZETİ

İlk defa Flor tarafından ortaya atılan ve bitki-patojen ilişkilerine olan algıyı temelinden değiştiren gene karşı gen hipotezi, patojendeki her bir dominant avirulenslik (Avr) genine karşılık konukçu bitkide soydaş bir dayanıklılık (R) geni olduğunu, iki gen ürünü arasındaki reaksiyonun, konukçuda aşırı duyarlılık (hypersensitive response) gibi bir dizi savunma mekanizmasını harekete geçirdiğini ve böylece konukçunun biyotrofik fungusların gelişimini sınırlandırdığını iddia etmektedir (Flor, 1942). Flor'un dayanıklılık ıslahı çalışmalarına ışık tutan çalışmalarının ardından, birçok araştırmacı O'nun hipotezinin moleküler ve biyokimyasal kanıtlarını bulabilmek için çalışmalar yürütmüşlerdir. İlk bakteriyel Avr geni 1984'de, ilk fungal Avr geni 1991'de (van Kan vd., 1991) ve ilk Oomycete Avr geni ise 2004'te (Shan vd., 2004) klonlanmıştır.

Öte yandan Avr genlerinin ürünleri, soydaş bir R geni taşımayan bitkilerde, virülenslik faktörü olarak işlev görürler. Kısacacı patojen tarafından salgılanan ve "efektör" olarak isimlendirilen bazı proteinler konukçu hücrenin yapısını ve fonksiyonunu değiştirip konukçunun savunma sistemini baskılayarak patojenin konukçu bitkiyi kolonizasyonunu sağlarlar ya da R geni taşıyan bitkilerde konukçunun savunma sistemini harekete geçirerek dayanıklılık oluşmasına neden olurlar (De Jonge ve Thomma, 2009).

Son yirmi yıldır yeni Avr ve R genlerinin tanımlanması bitki-mikrop interaksiyonlarındaki bilgi birikimini önemli ölçüde arttırmıştır. Patojen saldırılarına tepki olarak bitkiler en az iki temel savunma mekanizmasını aktive ederler. İlk sistem bütün potansiyel patojenlere karşı gösterilen basal defans mekanizmasıdır ve patojen tarafından salgılanan bazı moleküllerin (Patojen Associated Molecular Patterns- PAMPs) tanınması temelinde, PAMP tarafından tetiklenen bağışıklığı (PAMP Triggered Immunity- PTI) aktive eden, ünlü PAMP tanıma reseptörleri yardımıyla (PAMP Recognition Receptors- PRRs) gerçekleşir. Bu dayanıklılık mekanizmasının aktive edilmesi konukçunun patojen tarafından daha fazla kolonize edilmesini durdurur (de Wit, 2007; Jones ve Dangl, 2006). En iyi bilinen fungal PAMP'lardan biri fungal hücre duvarının da yapıtaşı olan ve Arabidopsis ve çeltikte kendisi için Lysin motif tipi (LysM-type) reseptörün tanımlandığı kitindir (Kaku vd., 2006; Miya vd., 2007). Şu an bazı Avr genlerinin kodladığı efektör proteinlerinin bitkideki PTI mekanizmasını baskılayarak

patojenin bitkiyi istila etmesine ve hastalık oluşturmaya yol açtığını gösteren kanıtlar vardır. Bitkinin basal savunma mekanizması patojen tarafından bir kez alt edildiğinde devreye giren ve bitkideki R geni tarafından kodlanan R proteini aracılığıyla fungal efektörün algılanması ve bunun sonucunda da efektör tarafından tetiklenen bağışıklık (Effector Triggered Immunity- ETI) denilen bir sistem oluşturulmuştur. Bu sistem bitkilerde hipersensitif yanıt (HR) gibi hızlı ve güçlü savunma reflekslerinin gösterilmesine yol açar. Bu ikinci sistem patojen tarafından salgılanan efektörde oluşan mutasyonlarla patojenin bitkinin tanımasından kaçması ve bitkideki dayanıklılık geninin geçirdiği mutasyonlarla yeni tip efektörü tanıır hale gelmesi ile sonuçlanan sürekli döngü yaratır (de Wit, 2007; Jones ve Dangl, 2006).

Septorya yaprak lekesi etmeni *Z. tritici* bitkiye girişinin ardından bitki tarafından tanınmadan geçirdiği, biyotrof olarak da adlandırılan latent periyodun ardından, bitkideki hücre ölümüyle son bulan nekrotrofik bir evreye sahiptir. Sanchez-Vallet vd., (2015) bu durumu hemi-biyotrofidan daha çok “latent nekrotrofi” olarak adlandırmışlardır. Nitekim fungus stomadan bitkiye girişinin ardından yaklaşık 9-16 günlük semptomsuz evre boyunca konukçu hücrelerine girmeden hücre arası boşlukta gelişmektedir (Kema vd., 1997). Birçok araştırmacı bu semptomsuz evrede fungusun bitkideki dayanıklılık mekanizmasını baskılamak için hücre arasına efektörlerini salgıladığını iddia etmektedir (Hammond-Kosack ve Rudd, 2008) ve farklı çalışmalarda olası Septorya efektörlerine ait bazı aday genler belirlemişlerdir (Kellner vd., 2014; Palma-Guerrero vd., 2017; Rudd vd., 2015).

Bu araştırma ekipleri tarafından efektör adayı olarak belirlenen genlerin genel özelliklerinin SSP oldukları anlaşılmaktadır. Belirlenen olası adayların fonksiyonlarının belirlendiği, bu fungustaki efektör proteinlerini tanımlamak adına yapılmış birkaç araştırmaya rastlanmaktadır. Bu çalışmaların birisinde Matteram vd. (2009), başka funguslar tarafından üretilen ve dikotiledon bitkilerde hücre ölümü ve savunma sinyal mekanizmalarını harekete geçirdiği bilinen NLP (Necrosis and ethylene inducing-peptide 1 (Nep1) like proteine) familyasına ait proteini kodlayan MgNLP geninin, bu fungustaki fonksiyonunu araştırmışlardır. Araştırmacılar, MgNLP proteininin çeşitli süreçler sonunda saflaştırılarak *Nicotiana benthamiana* yapraklarına infiltrasyonunun, bu bitkide programlanmış hücre ölümünü harekete geçirmesine rağmen, hassas buğday konukçuda herhangi bir etki oluşturmadığını ifade etmişlerdir. MgNLP infiltrasyonunun ayrıca buğdayda mitojen tarafından aktive edilen kinazları (MAPKs) da harekete geçirmede başarısız olduğunu ifade etmişlerdir. Sonuç olarak MgNLP geninin fungusta aktivitesinin durdurulmasının (targeted deletion), fungusun patojenisite

ya da virülensliğinde herhangi bir tespit edilebilir etki oluşturmadığını, bu durumun da ilgili genin fungusun konukçuyu infeksiyonu süresince ana virülenslik faktörü olamayacağı şeklinde yorumlanabileceğini belirtmişlerdir.

Yine aynı ekip tarafından yakın zamanda tamamlanan bir çalışmada, domates yaprak küfü hastalığı etmeni *Cladosporium fulvum*'da patojenisite ile ilişki olduğu belirlenen LysM (Lysin domain-containing effector) tipi proteini kodlayan Ecp6 geninin, *Z. tritici*'de 3 adet homologunun (Mg3LysM, Mg1LysM ve MgxLysM) bulunduğu belirtilmiştir. Bu genlerden ikisinin fungustaki gerçek rolünün anlaşılması için yaptıkları çalışmalarda Mg3LysM ve Mg1LysM genlerinin simptomsuz evrede yüksek derecede transkripte edildiğini ortaya koymuşlardır. *C. fulvum*'daki Ecp6'nın aksine, her iki genin, bitkinin ürettiği hidrolitik enzimlere karşı fungus hiflerini koruduğunu ve her iki genin de non-sinonim amino asit değişikliğine yol açan önemli nükleotid polimorfizmine sahip olduklarını belirtmişlerdir. Mg3LysM geni silinmiş mutant strainler patojenisitelerinden birşey kaybetmezken, Mg1LysM geni silinmiş mutantların önemli derecede patojenisite kaybı yaşadığını rapor etmişlerdir. Öyle ki bu mutantların yaprak kolonizasyonunda yetersizlik, lezyon oluşturmama ve aseksüel sporalosyona geçememe gibi özellikler sergilediğini gözlemlemişlerdir. Bu virülenslik kaybının yaprak kolonizasyonunun simptomsuz evresinde, buğday savunma genlerinin daha hızlı ve belirgin bir şekilde ekspresyonu ile ilişki olduğunu vurgulamışlardır (Marshall vd., 2011) Septorya yaprak lekesine karşı buğdayda belirlenmiş 21 adet R geni tanımlanmış (Brown vd., 2015) ve gene karşı gen hipotezinin Septorya- buğday interaksiyonlarının anlaşılmasında önemli bir olgu olduğu ifade edilmiştir. Bu ilişkinin kesin olarak ispatlanması ise çok yakın zamanda yayınlanan bir dizi çalışmayla gerçekleştirilmiştir. Zhong et al. (2017) tarafından Stb6 direnç genine sahip buğday çeşitleri üzerinde farklı patojenik karakter gösteren izolatların melezlenmesi ile elde edilen popülasyon üzerinde QTL ve GWAS (Genome Wide Association Studies) analizleri ile *AvrStb6* genini klonlamayı başarmışlardır. Yine Rothamsted Research'ten Kostya Kanyuka ve ekibi tarafından buğdayda bu patojene karşı gene karşı gen sistemiyle çalışan ilk buğday direnç geni (Stb6) klonlanmış ve patentlenmiştir (Saintenac vd., 2018).

Septoria hastalığına karşı yapılacak dayanıklılık ıslahı çalışmalarında majör genlerin kullanımı çok etkin ve hızlı sonuçlar verse de patojen tarafından hızla dayanıklılık kırılabilir. Bu nedenle "gen yığma ya da pramitleme" olarak adlandırılan, bir bitkide birden fazla majör genin ya da QTL bölgesinin bir araya getirilmesini sağlayacak yaklaşımlar en doğru olanıdır. Bu çalışmalara başlanabilmesi için öncelikle mevcut patojen popülasyonu hakkında yeterli bilgiye



sahip olmak ve hangi dayanıklılık genlerinin kullanılabilir olduğunun belirlenmesi gerekmektedir. Ankara Zirai Mücadele Merkez Araştırma Enstitüsü (AZMMAE) tarafından yakın zamanda tamamlanan patojenik karakterizasyon çalışmasında, ülkemizin farklı buğday üretim alanlarından toplanan Septoria izolatları kullanılmış ve bu koleksiyondaki izolatların ırk ayırıcı setteki Stb4, Stb6 ve Stb12 genlerini içeren bitkileri ya hiç hastalandıramadığı ya da bu bitkiler üzerinde çok düşük düzeyde hastalık oluşturabildiği ortaya konulmuştur (Turgay, 2016). Bu çalışma, Ülkemizde de patojenin önemli düzeyde varyasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Yine, “gene karşı gen” hipotezini destekler şekilde bazı izolatların belirli bir dayanıklılık genini içeren buğday hatlarını hastalandırıp diğerlerini hastalandıramaması bu izolatlarda spesifik fungal efektörlerin varlığına işaret etmektedir. Bu efektörlerin belirlenmesi ve buradan elde edilecek verinin buğday ıslah programlarına entegrasyonu büyük önem taşımaktadır.

Buğdayda septorya yaprak lekesine karşı tanımlanan 21 adet dayanıklılık geninden bu güne kadar sadece 1 tanesi klonlanabilmiş ve bu genle ilişkili sadece 1 adet efektör protein (*AvrStb6*) klonlanabilmiştir. Dolayısı ile Septorya-Buğday interaksiyonlarının daha fazla anlaşılabilmesi ve etmene karşı patojenden türetilmiş informasyonun kullanılması yoluyla dayanıklılık ıslahına yön verilebilmesi için daha kat edilecek çok yol olduğu anlaşılmaktadır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1 Gereç

Çalışmanın ana materyalini *Z. tritici*'nin yurtdışından temin edilen IPO323 kodlu izolatu, *Z. tritici* genomunda yer alan SSP genleri (Tablo 1), çeşitli vektörler (pCHYG), *Escherichia coli* (DH5 $\alpha$ ) ve *Agrobacterium tumefaciens* (AGL1) competent strainleri, çeşitli besi yerleri, kimyasallar oluşturmuştur. Gen silme kasetlerinin oluşturulmasında GENEIOUS R6 genetik analiz programı kullanılmıştır. Yine çalışılan genlere ait sekans verileri [www.jgi.org](http://www.jgi.org) adresinden ilgili gen kodları girilerek indirilmiştir.

Tablo 1. Çalışmada fonksiyonu araştırılan *Z. tritici* SSP genleri (Amaral ve ark., 2012)

No	Gen Kodu	Olgun protein uzunluğu (aa)	Cysteine sayısı	Cysteine oranı
1	87205	33	8	24,24
2	83081	33	6	18,18
3	104444	58	10	17,24
8	79286	43	6	13,95
9	100649	58	8	13,79
17	104383	55	6	10,91
19	104758	96	10	10,42
22	105826	78	8	10,26

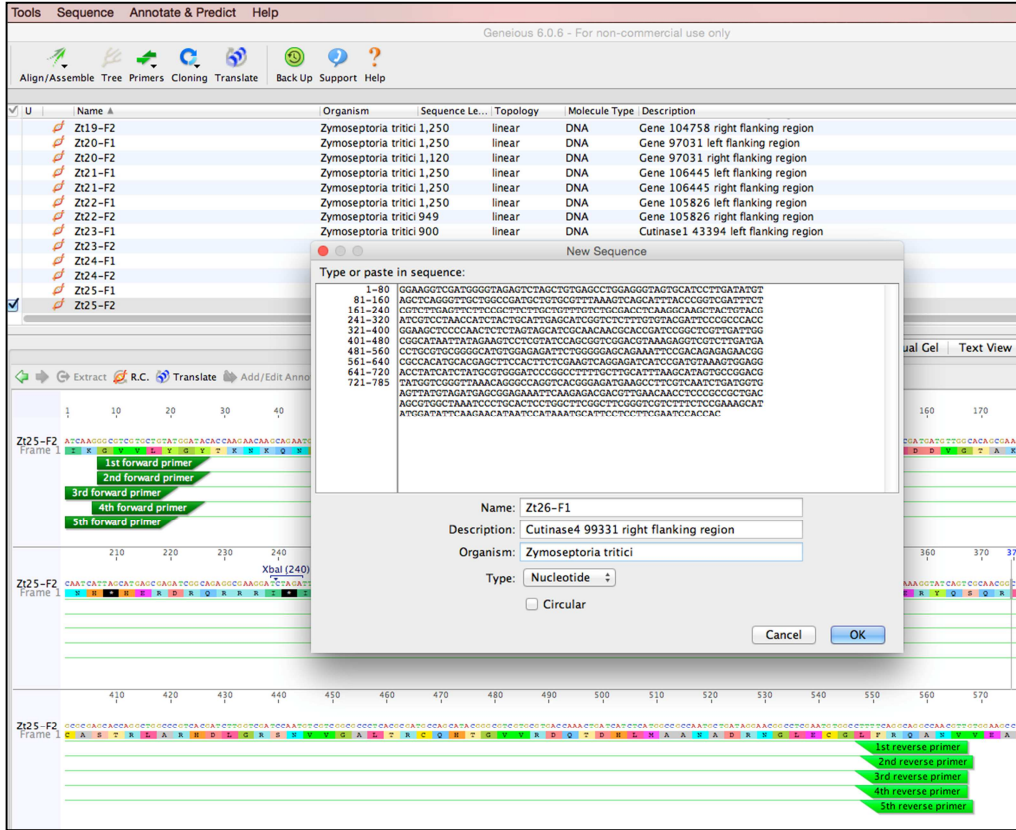
#### 3.2 Metot

##### 3.2.1 Nükleik asit izolasyonu ve manipülasyonu

Bu amaçla yurtdışından temin edilen IPO323 izolatu sıvı YPD besi yerinde 7 gün süre ile geliştirilmiş ve bu sürenin sonunda süzülerek DNA izolasyonuna başlanmıştır. Örneklerden DNA izolasyonu Doyle (1991)'ye göre CTAB ekstraksiyonu ilkeleri çerçevesinde yapılmıştır. İşlem sonunda IPO323 izolatından 240 ng/  $\mu$ L DNA elde edilmiş ve -20'de muhafaza altına alınmıştır. Yurtdışından temin edilen standart izolatın çoğaltılmasında kullanılan tüm

malzemeler otoklavdan geçirilerek imha edilmiş ve bulaşıklığın önlenmesi için gerekli tedbirler alınmıştır.

Gen silme kasetlerinin oluşturulması amacıyla [www.igi.org](http://www.igi.org) adresinden SSP genlerine ait kodlar girilerek ilgili genlerin kromozomal pozisyonları incelenmiş ve bu bilgilere göre genlerin 5' ve 3' bölgelerinde, klonlama sırasında kullanılacak bölgelere ait sekans dizileri Geneious genetik analiz programına uygun dosya adı verilerek kaydedilmiştir. Daha sonra bu bölgeler üzerindeki enzim kesim bölgeleri aynı program yardımıyla analiz edilmiş ve elde edilen veriler ışığında en uygun enzimler seçilmiş ve gen silme kasetlerini çoğaltmada kullanılacak primerler dizayn edilmiştir (Şekil 2). Dizayn edilen primerlere ait bilgiler Tablo 2'de verilmiştir. Bundan sonraki aşamalarda klonlama ve fungal transformasyon işlemlerine başlanmıştır.



Şekil 1 Silinecek genlerin 5' ve 3' yapışma bölgeleri için primer dizaynı

### 3.2.2 Gen silme kasetlerinin ve plasmidin klonlama için hazırlanması

Bu amaçla, gen silme kasetlerinin oluşturulması için elde edilen fragmentler (hedef genlerin 3' ve 5' yapışma bölgeleri) uygun Restrüksiyon enzimleri (RE) ile kesilmiştir. Bu aşamada fragmentlerin dizaynı sırasında primerlere eklenen RE kesim bölgeleri temelinde seçilen uygun enzimler (NEB ve Promega) ile "çift enzimli kesim" işlemi uygulanmıştır. Fragmentin her iki ucundaki enzim kesim

bölgeleri temelinde seçilen enzimlerin aynısı ile klonlamada kullanılacak pCHYG vektörü kesim işlemine tabi tutulmuştur. Enzim kesiminde gece boyunca (overnight) kesim protokolü uygulanmıştır (Tablo 3).

Tablo 2. Fragmentlerin ve vektörün uygun enzimlerle kesiminde kullanılan protokol

10X Enzim buffer	2,5 uL	Hazırlanan karışım 9 saat 1. Enzim için uygun sıcaklıkta, 9 saat- 2. Enzim için uygun sıcaklıkta tutulmuş, ardından enzimlerin deaktivasyonu için 65°C'de 10 dk bekletilmiştir. İnkübasyon için Thermo thermal cycler kullanılmıştır.
Enzim 1	0,5 uL	
Enzim 2	0,5 uL	
DNA (insert ya da plasmid)	500 ng	
ddH <sub>2</sub> O	up to 25 uL	

Ayrı ayrı çift enzimli kesim işlemine tabi tutulan insert ve plasmid DNA'ları jel purifikasyonu ile temizlenmiş ve NanoDrop ile miktarları belirlenmiştir. Böylelikle temizlenen ve miktarları belirlenen kesim ürünü insert ve plasmid DNA'ları ligasyon işlemine tabi tutulmuştur. T4 DNA ligaz (NEB) kullanılarak gerçekleştirilen bu işlemin detayları Tablo 4'de verilmiştir. Elde edilen kesim ürünleri %1'lik agaroz jelde koşulmuş, Jel purifikasyonunun ardından elde edilen ürün ile klonlama işlemine devam edilmiştir.

Tablo 3. Uygun enzimlerle kesilen ve temizlenen insert ve plasmid DNA'larına uygulanan ligasyon işleminin detayları

10X Enzim buffer	2 uL	Hazırlanan karışım 18 saat 16 °C sıcaklıkta tutulmuş, ardından enzimin deaktivasyonu için 65°C'de 10 dk bekletilmiştir. İnkübasyon için Thermo thermal cycler kullanılmıştır.
Insert DNA	37,5 ng	
Plasmid DNA	50 ng	
T4 DNA Ligaz	1 uL	
ddH <sub>2</sub> O	up to 20 uL	



### 3.2.3 Gen silme kasetlerini içeren plasmidin *E. coli*'ye klonlanması

Klonlama işleminde, competent *E. coli*'den kaynaklanacak aksaklıkların önüne geçebilmek için her klonlama işleminden önce kompetent hücreler taze olarak hazırlanmıştır. Bu amaçla *E.coli* Top-10 straini LB besi yeri içeren petri kaplarına (antibiyotiksiz) çizilmiş ve bir gece 37 °C'de gelişmeye bırakılmıştır. Gelişen tek bir koloniden LB broth besi yerine aşılama yapılmış ve yine 37 °C'de, 220 rpm'de gece boyunca geliştirilen kültürden, ertesi gün gelişen 0,5 mL alınarak 50 mL falcon tüpler içerisindeki LB sıvı besi yerine aktarılmıştır. Yaklaşık 3 saat 220 rpm ve 37 °C sıcaklıkta 600 nm'deki OD (optical density) değeri 0,3-0,4 aralığına ulaşana kadar inkübe edilmiştir. Bu yaklaşık 3-4 saat almıştır ve istenilen değere ulaştıncaya bir dizi santrifüj ve yıkama aşamasından sonra elde edilen *E.coli* kompetent hücreleri 100 µL'lik miktarlar halinde çözülerek klonlama işlemine geçilmiştir. Kompetent *E. coli* hücrelerinin transformasyonunda izlenen protokol aşağıda verilmiştir.

- Klonlanacak insert DNA'ları içeren ve jel purifikasyonu sonucu elde edilen plasmid stoğundan 1-3 uL ve CaCl<sub>2</sub> içerisinde çözülen kompetent *E.coli* hücrelerinden 100 uL alınarak 1.5 mL'lik ependorf tüplere alınmış ve karışım 10 dk buzda bekletilmiştir.
- Hazırlanan tüpler daha önceden 42°C'ye ayarlanmış su banyosuna tam olarak 45 s süre ile daldırılmıştır.
- Sıcaklık şokunun ardından tüpler yine 5 dk süre ile buz içerisinde bekletilmiştir.
- Tüpler 1-2 saat süre ile 220 rpm ve 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde inkübe edilmiştir.
- Daha önceden hazırlanan ve 50 mg/mL Kanamycin içeren LB Agar besi yeri içeren petrilere gelişen kültür ekilmiştir. Kontrol olarak plasmid içermeyen *E. coli* competent kültürleri kullanılmıştır.

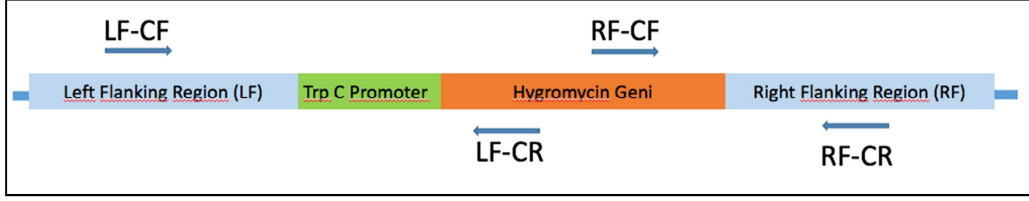
Ekilen petriler gece boyunca 37°C'ye ayarlanmış inkübatörde inkübe edilmiştir.

### 3.2.4 *E. coli* transformasyon işleminin doğrulanması

Transformasyon işleminin doğruluğu koloni PCR ile gerçekleştirilmiştir. Koloni PCR işlemiyle hem fragmentin bir bütün olarak plasmid içinde olup olmadığı hem de plasmid üzerinde doğru pozisyona klonlanıp klonlanmadığı kontrol edilmiştir. Birinci amaç için klonlama işleminden önce fragmentlerin üretiminde kullanılan primerler kullanılırken, klonlamanın doğruluğu fragmentin ve Higromisin direnç



geninin içinden dizayn edilen primerler ile gerçekleştirilmiştir. Burada kullanılan yaklaşım Şekil 5'te verilmektedir. Kullanılan primer dizileri EK.1 'de verilmiştir.



Şekil 2. Klonlanan insertlerin pozisyonunu analiz etmek için kullanılan primerlerin dizaynında kullanılan yaklaşım (LF-CF: Left flanking control-forward; LF-CR: Left flanking control-reverse; RF-CF: Left flanking control-forward; RF-CR: Left flanking control-reverse)

Koloni PCR işleminde kullanılan PCR içeriği Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. Koloni PCR için kullanılan karışımın içeriği

	Konsantrasyon	Örnek başına µl
PCR buffer	10 X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2
dNTP	10 mM	0.5
Primer (F)	10 µM	1.25
Primer (R)	10 µM	1.25
Taq	5 U/ µL	0.2
ddH <sub>2</sub> O	-	17.3
DNA	-	Koloniden çok az bakteri
<b>Toplam</b>		<b>25 µL</b>

PCR döngü koşulları 94 °C'de 85 s ilk denatürasyon; 95°C'de 30 s denatürasyon, 58°C'de 30 s yapışma ve 72°C'de 1 dk uzama aşamalarından oluşan 35 döngü ve son uzama 72 °C'de 5 dk. olarak ayarlanmıştır.

Sağ (5') yapışma bölgesi aktarılan plasmidler, plasmid purifikasyon kiti yardımıyla saflaştırılmış, ardından 3' yapışma bölgesini içeren fragmentin klonlanması için yukarıda detaylı anlatılan işlemler tekrarlanmıştır. Son aşamada her iki yapışma fragmentinin başarılı bir şekilde klonlandığı düşünülen plasmidler, yine plasmid purifikasyon kiti yardımıyla temizlenmiş ve bu plasmidlerin kalıp olarak kullanıldığı PCR işlemi ile tüm gen silme kasedinin doğru bir şekilde klonlandığı doğrulanmıştır. PCR mix içeriği ve koşulları Tablo 4'te verildiği şekilde olmuştur.

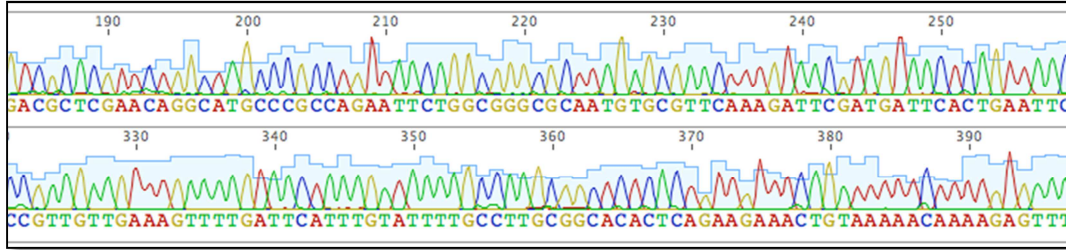
*E. coli* transformasyonu işleminin doğruluğu sekans analizleri ile de kontrol edilmiştir. Koloni PCR'de pozitif sonuç veren bazı örnekler dizi analizine tabi

tutularak koloni PCR sonuçları çift kontrolden geçirilmiştir. Bu amaçla sekans analizi yapılacak kasede ait fragmentler ve fragmentlerin koloni PCR sırasında kontrolünde kullanılan primerler kullanılarak “Cycle Sequencing PCR” işlemi yapılmıştır, hazırlanan PCR mix'in içeriği Tablo 5'te verildiği gibi olmuştur.

Tablo 5. Sekanslama işlemi için gerçekleştirilen Cycle Seq PCR karışımının içeriği

	Konsantrasyon	Örnek başına $\mu\text{L}$
Sequencing Buffer	5 X	2
Big Dye	-	1.25
Primer (F)	10 $\mu\text{M}$	1.25
ddH <sub>2</sub> O	-	5.43
DNA	-	1 (Exosup uygulanmış PCR ürününden)
<b>Toplam</b>		<b>10 <math>\mu\text{L}</math></b>

Elde edilen ürün Sekans temizleme kiti kullanılarak temizlendikten sonra ABI3500 kapillar elektroforez cihazında Sanger dizilemeye tabi tutulmuştur. Veriler Geneious genetik analiz programı yardımıyla analiz edilmiş ve elde edilen kasedin plasmid üzerindeki pozisyonu belirlenmiştir (Şekil 3).



Şekil 3. Sekans analizlerinden bir görüntü

Kontrol işlemlerinin ardından, tüm gen silme kasedini içerdiği belirlenen plasmidler kullanılarak Agrobacterium transformasyonu aşamasına geçilmiştir.

### 3.2.5 Gen Silme Kasetlerini İçeren Plasmidlerin Agrobacterium'a Klonlanması

#### *Kompetent Hücre Hazırlığı*

Bu amaçla öncelikle kompetent Agrobacterium hücre kültürleri oluşturulmuştur.

- Transformasyonda kullanılacak, Agrobacterium AGL1 strainine ait -80 stok kültüründen bir miktar alınarak LB Agar besiyeri yerine aktarılmıştır.

- 28 °C'de 2-3 boyunca gelişmeye bırakılan petrilere tek bir koloni seçilerek 5 mL LB besi yerine aktarılmış ve yine 28 °C'de 200 rpm'de gece boyunca gelişmeye bırakılmıştır.
- Ertesi gün gelişen taze kültürden 2 mL alınarak 125 mL flask içerisine konulan, 50 mL LB besi yerine eklenmiştir.
- Flasklar yine 28 °C'de 200 rpm'de gelişmeye bırakılmıştır. Hücre süspansiyonunun yoğunluğu belirli aralıklarla spektrofotometre cihazında kontrol edilerek 600 nm dalga boyundaki OD değeri 0.5-1 aralığına ulaşıncaya kadar inkübasyona devam edilmiştir.
- Bakteri kültürünün yoğunluğu bu değere ulaştığında, flasklar buz üzerinde 30 dk süre ile soğumaya bırakılmıştır.
- Daha sonra bakteri kültürü 50 mL'lik falcon tüplere dökülmüş ve 4 °C'de 3000 g'de 5 dk. santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant kısım dökülmüş ve dibe çöken bakteri hücre peleti 1 mL (20 mM) soğuk CaCl<sub>2</sub> çözeltisinde çözölmüştür.
- Süspansiyon 100 uL'lik parçalara ayrılmış ve hemen kullanılmayacak olan kompetent hücreler, tüpler sıvı azotla muamele edilerek derhal -80 °C'de muhafaza altına alınmıştır.

### **Transformasyon**

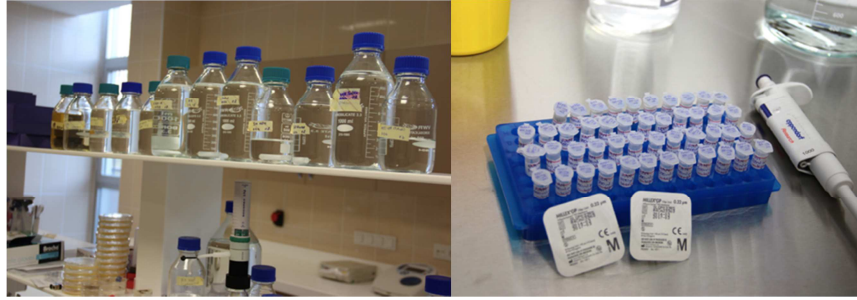
- Gen silme kasetlerini (F1+HYG+F2) içeren 1 ug plasmid 100 uL kompetent AGL1 hücresi içeren 1.5 mL'lik ependorf tüpe eklenmiş ve karışım 37 °C'deki su banyosunda 5 dk. inkübe edilmiştir.
- İnkübasyonun ardından plasmid+hücre süspansiyonunu üzerine 1 mL LB besi yeri eklenmiş ve karışım 15 mL falcon tüpe transfer edilmiştir.
- Tüpler 28°C'de 2-4 saat 200 rpm'de inkübe edilmiştir.
- Gelişen hücre süspansiyonundan bir miktar alınarak Kanamisin'li LB Agar besi yeri içeren petrilere çizim yapılmıştır.
- Petrilere 28°C'de 2-3 gün gelişmeye bırakılmış ve gelişen koloniler kullanılarak, transformasyon işleminin doğrulanması için koloni PCR işlemi yapılmıştır.
- Transformasyonun doğruluğu ispatlanan koloniler sıvı besi yerinde geliştirilmiş sonra %20 gliserol içerisinde -80'de muhafaza altına alınmıştır. Kasetlerin başarıyla aktarıldığı bu *Agrobacterium* kolonileri projenin bir sonraki aşamasında *Septoria* patojeninin transformasyonunda kullanılacaktır.

### 3.2.6 SSP Genlerinin *Zymoseptoria tritici* Genomundan Silinmesi Çalışmaları

*Agrobacterium*'a klonlama işlemi tamamlanan SSP genleri için gen silme sürecinin son aşaması olan “*Z. tritici*’nin *Agrobacterium* Mediated Transmorfasyonu” aşamasına geçilmiştir. Yapılan işlemler sırasıyla;

#### Ön Hazırlık

- Transformasyondan 6-7 gün önce, -80°C’de %50 gliserol stokta muhafaza edilen *Septoria* IPO323 izolatı, YPD besi yerine ekilmiş ve 16-18°C’de gelişmeye bırakılmıştır.
- Transformasyondan önce gen silme kasedini ihtiva eden AGL1 Agro straini Kanamisin (Kan) içeren LB besi yerine ekilmiş ve parafilm ile sarılarak 28°C’de gelişmeye bırakılmıştır.
- Transformasyon işleminden bir gün önce 40 mL LB-Mannitol + 40 uL Kan (50 mg/mL) içeren flasklara bir öze yardımıyla kazınan AGL1 straini aşılanmıştır.
- Yaklaşık 20 saat 28°C’de 220 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır.
- Yine transformasyondan bir gün önce silinecek her bir gen için 100 mL Induction Medium (IM) hazırlanmıştır.



Şekil 4. Transformasyon sırasında besi yerleri ve tamponların hazırlanması için kullanılan çözeltiler ve filtre sterilizasyonu için hazırlanan Kanamisin ve Hygromisin antibiyotik stokları

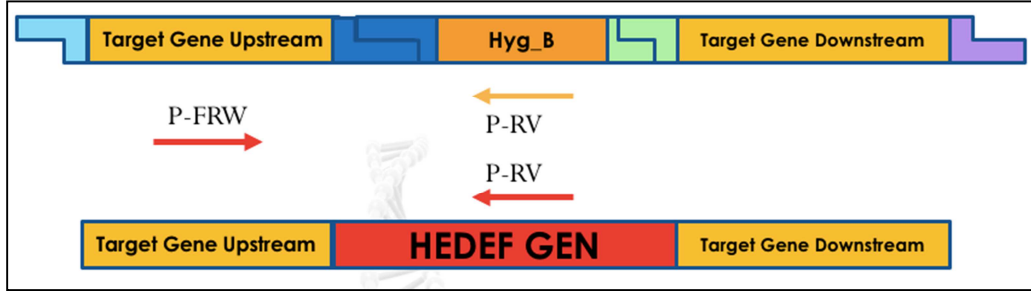
#### ***Z. tritici* Transformasyonu**

- IM + Acetosyringone (AS) petrileri hazırlanmıştır
- Her bir strain için içerisinde 100 uL AS (40 mg/mL in DMSO) içeren 100 mL IM+AS medium hazırlanmıştır.
- 2 mL’lik vida kapaklı ependorf tüplere, bir önceki gün gelişmeye bırakılan *Agrobacterium* strain’inden 2 mL alınarak 13.000 rpm’de 2 dak. santrifüj edilmiştir.

- Süpernatant dökülerek oluşan pellet 400 uL IM:AS ortamında çözündürülmüştür.
- 2 dk 13 000 rpm'de santrijüf edilmiştir.
- 100 mL IM:AS:Kan medium hazırlanmıştır.
- Her bir pelet 1 mL IM:AS:Kan ortamında çözölmüştür.
- Elde edilen süspansiyon 9 mL IM:AS:Kan içeren 250 mL'lik erlenlere konularak, OD<sub>660</sub> değerleri ölçölmüş ve 0.15 olacak şekilde ayarlanmıştır.
- Flasklar 28°C'de 3 saat 220 rpm'de inkübasyona bırakılmıştır.
- Bu arada YPD besi yeri üzerinde gelişmeye bırakılan *Z. tritici* költüründen öze ile kazınan fungal sporlar 30 mL IM:AS:Kan ortamına konulmuş ve yoğunluğu  $1.6 \times 10^7$  spor/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Bakteri költürleri hazır olana kadar, spor süspansiyonu buz içerisinde bekletilmiştir.
- Daha önceden kurutma kağıdı arasında steril edilen selöloz diskler, 200 uL IM:AS:Kan ortamı dökölmüş IM:AS petrileri üzerine hava kabarcığı kalmayacak şekilde yayılmış ve kurumaya bırakılmıştır.
- 1.5 mL ependorf tüpün içersine 500 uL daha önce yoğunlukları ayarlanmış *Z. tritici* ve *Agrobacterium* költürleri ile 5 uL AS eklenmiştir.
- Hazırlanan karışımından 200 uL alınarak IM+AS+membran içeren petri üzerine yayılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan petrilere parafilm çekilmeden birbirine sabitlenmiş ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır.
- İki günlük inkübasyonun ardından selefön diskler, hazırlanan *Aspergillus* Minimal Medium:Timentin:Hygromisin petrilere, steril koşullar altında aktarılmıştır. Bu aşamada Timentinin ortamdaki *Agrobacterium* hücrelerini, Hygromisinin de transforme olmayan *Z. tritici* sporlarını öldürmesi beklenmiştir.
- Yaklaşık 2 haftalık bir inkübasyonun ardından, beyaz pamuksu oluşumlar şeklinde ilk transformant *Z. tritici* kolonileri ortaya çıkmaya başlamıştır
- Gelişen her bir koloni bağımsız olarak *Aspergillus* Minimal Medium:Timentin: Hygromisin içeren petrilere 2-3 kez alt költür yapılmış böylelikle sadece silinmek istenen genlere ait HYG kasetlerini içeren költürlerin varlığından emin olunmuştur.
- Bu kasetlerin bir bütün olarak oluşan mutant izolatların genomları içersinde olup olmadıklarını görebilmek için, kaset oluşturulmasında kullanılan primer setleri ile detayları bir önceki rapor döneminde açıklandığı şekilde, her bir gen için 2 adet kolonide PCR işlemi gerçekleştirilmiş ve kasedin başarı ile *Z. tritici* genomuna klonlandığı anlaşılmıştır. Gen silme işlemi tamamlanan izolatlar %50 gliserol

içerisinde -80'de muhafaza altına alınmıştır.

Kasetlerin tam olarak *Z. tritici*'ye aktarıldığının belirlenmesinin ardından, bu kez kasetlerin tam olarak hedef bölgeye klonlanıp klonlanmadığı kontrol edilmiştir. Bu amaçla kullanılan primerlerin dizaynında kullanılan yaklaşım Şekil 5'de verilmektedir.



Şekil 5. Gen silme işleminin doğrulanması için primer dizaynı: P-FRW hedef genin dışından dizayn edilen primer, P-RV hedef genin içinden dizayn edilen primer.

Gen silme işlemi başarı ile tamamlanan SSP genlerinin, fungusun hastalandırma yeteneği üzerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla, mutant izolat kullanılarak patojenisite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

### 3.3. Geni silinen *Z. tritici* strainlerinin patojenisitelerinin belirlenmesi

İnokulasyonda kullanılacak sporlar, YPD besi yerinde geliştirilen 7 günlük IPO323 izolatından elde edilmiştir. Bitki infeksiyonu için 24X15 ebatlarında plastik kaplarda her gen adayı için 4 tekrerrür ve her tekrerrürde 10 bitki olacak şekilde ekilmiştir. Geliştirilen 14-21 günlük buğday bitkisinin 2.yaprağı düz bir zemin üzerine iki tarafı yapışkan bant ile sabitlenmiş ve sabitlenen bölgeler arasında kalan yaprak alanı  $1 \times 10^7/\text{mL}$  spor yoğunluğuna ayarlanmış *Z. tritici* spor süspansiyonu ve pamuk uçlu steril çubuklar yardımıyla inokule edilmiştir. İnokulasyonun ardından 72 saat süreyle %100 nemde inkübe edilen olan bitkilerden hastalık okumaları 3 hafta sonra 0-5 skalasına göre yapılmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Hastalık şiddetinin hesaplanmasında kullanılacak skala

0	Yaprak alanında piknit yok
1	Yaprak alanı %1-20 piknit ile kaplı
2	Yaprak alanı %21-40 piknit ile kaplı
3	Yaprak alanı %41-60 piknit ile kaplı
4	Yaprak alanı %61-80 piknit ile kaplı

5	Yaprak alanı %81-100 piknit ile kaplı
---	---------------------------------------

Yapılacak okumalar sonunda her gen için hastalık şiddeti Tawsend-Heuberger formülü kullanılarak yapılmıştır. Buna göre

$$\text{Hastalık Şiddeti (\%)} = [ \sum (n.V) / Z.N ] / 100$$

n : Skalada farklı hastalık derecelerine isabet eden örnek adedi,

V: Skala değeri,

Z: En yüksek skala değeri,

N: Gözlem yapılan toplam örnek adedi olarak kabul edilecektir. Sonuçlar varyans analizlerine tabi tutulmuştur.



Şekil 6. Gen silme işleminin etkilerinin değerlendirilmesinde kullanılan patojenisite testlerinin optimizasyonu çalışmaları



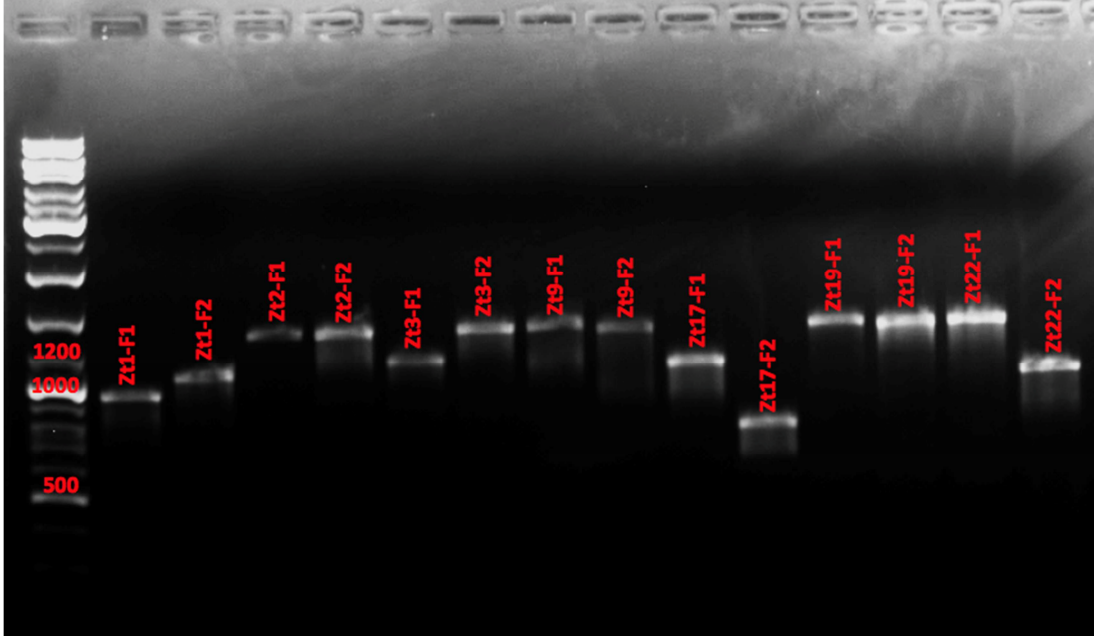




Tablo 7. Gen silme kasetlerinin eldesi için dizayn edilen primer ve enzim kesim bölgelerine ait bilgiler

GEN NO	GEN KODU	Primer Adı	Nükleotid Dizisi	İlgili Enzim	Beklenen Bant Uzunluğu(bp)*
1	87205	Zt1-F1_F	TAAGCAGGGCCACACAAAACCGTCAGCATTG	Apa I	905
		Zt1-F1_R	TGCTTAGAATTCATCCACCGCTCTGCTTGTA	EcoR I	
		Zt1-F1_CF	TGCTCCATGACATGTTGACA		151
		Zt1-F2_F	AAGGATCCGACCTTCGACTCAATCTCAA	BamH I	988
		Zt1-F2_R	AAGTCGACGAGGAGAACGCGAAGGACA	Sal I	
		Zt1-F2_CR	CTCAATGGCAGAAAAGGCTCG		307
2	83081	Zt2-F1_F	TAAGCAGGGCCCGCGCGTCCGAGTAATACTAT	Apa I	1.230
		Zt2-F1_R	TGCTTAGAATTCATGGTTGAGCGGAAGCTTTG	EcoR I	
		Zt2-F1_CF	AGCGGATTACGAGCAACTGA		254
		Zt2-F2_F	TAAGCAGGATCCACTTCACCATTTGATCTTCACCCA	BamH I	1.240
		Zt2-F2_R	TGCTTAGTCGACTCCAAAACATCATTGCGGG	Sal I	
		Zt2-F2_CR	GCATTGCTTCATCTGAGCGAG		368
3	104444	Zt3-F1_F	TAAGCAGGGCCCGTAACGACGCTAGACTACCC	Apa I	1.036
		Zt3-F1_R	TGCTTAGAATTCACACCAAGTCGTTGCACATT	EcoR I	
		Zt3-F1_CF	TCCTTATACGTAGACGCTCCT		604
		Zt3-F2_F	TAAGCAGGATCCCTCTGCTGAGCTGGTGAAGTAC	BamH I	1.237
		Zt3-F2_R	TGCTTAGTCGACAGCTCAACTGCTACTTCGTGGG	Sal I	
		Zt3-F2_CR	CAGACCACATGTTGCCACAAG		334
8	79286	Zt8-F1_F	TAAGCAGGGCCCATAGACCAAGTCCGTCGTC	Apa I	1.236
		Zt8-F1_R	TGCTTAGAATTCACAAGCTTCTGGCCTGACAG	EcoR I	
		Zt8-F1_CF	GGCTGTCATCCACTCCTTCA		315+HPH-LR
		Zt8-F2_F	TAAGCAGGATCCCTACAGCGAACCAACCACTT	BamH I	859
		Zt8-F2_R	TGCTTAGGATCCTCTGAGGTGAGGTGAAGGAT	Xba I	
		Zt8-F2_CR	TCTCGAGTTGAACAAGACCG		HPH-RF+405
9	100649	Zt9-F1_F	TAAGCAGGGCCCTTATCACTCCAGCGATGGC	Apa I	1.248
		Zt9-F1_R	TGCTTAGAATTCGAGGGTGTCTTTCGTTTGTG	EcoR I	
		Zt9-F1_CF	AAGCTCCGACGCAAGACTAA		954
		Zt9-F2_F	TAAGCAGGATCCACAGTCCTTACCCAGGCATA	BamH I	1.231
		Zt9-F2_R	TGCTTAGTCGACCCCAATAGCGTCGAATAAGCA	Sal I	
		Zt9-F2_CR	CACTTCGTCCCGAAAAACAAC		432
17	104383	Zt17-F1_F	TAAGCAGGGCCCGCTTACATTGGTCGGGAAAGC	Apa I	1008
		Zt17-F1_R	TGCTTAGAATTCAGGAAATGCGCTATTGCCTC	EcoR I	
		Zt17-F1_CF	CTCCGAGCAGGATTCAAAGT		857
		Zt17-F2_F	TAAGCAGGATCCCAAAGTGTCTCAGCTTTCGGG	BamH I	692
		Zt17-F2_R	TGCTTAGTCGACATTGCTGCTAGGTCTGGCG	Sal I	
		Zt17-F2_CR	CCGTCCGATCAGCCATTGATA		592
19	104758	Zt19-F1_F	TAAGCAGGGCCCTTCTAAAGCTACCGAAAAGAAGA	Apa I	1.230
		Zt19-F1_R	TGCTTAGAATTCACGGAATGATATAGTGGCCGC	EcoR I	
		Zt19-F1_CF	TGCATGTAGCCACCAGAACAT		1038
		Zt19-F2_F	TAAGCAGGATCCATGATGAGGAGGGCAAAGAGC	BamH I	1.230
		Zt19-F2_R	TGCTTATCTAGAACCTCGATGTAGCTGCCCTA	Xba I	
		Zt20-F2_CR	TGTGCGAAGATGCTGTACAGT		653
22	105826	Zt22-F1_F	TAAGCAGGGCCCTGTAGTTAGACGGAAGCTCTGT	Apa I	1.236
		Zt22-F1_R	TGCTTAGAATTCAGCAAAACCTCGACTCTCCAT	EcoR I	
		Zt22-F1_CF	TGCTCTCAGTCGTCGATGATG		883
		Zt22-F2_F	TAAGCAGGATCCGCAACGAACAGCAGGGTTGTC	BamH I	910
		Zt22-F2_R	TGCTTATCTAGAGTTGCCATGGGGATTGAAAT	Xba I	
		Zt22-F2_CR	CACGGAGAGAAAAGTGGTCGA		494

Bu primer dizileri ve wild type IPO323 izolatından elde edilen fungal DNA kullanılarak, hedef genlerin silinmesinde kullanılan kasetlerin eldesi için “gen yapışma bölgesi” fragmentleri başarı ile elde edilmiştir (Şekil 8)



Şekil 8. Gen silme kasetlerinin oluşturulması için çoğaltılan gen yapışma bölgeleri.

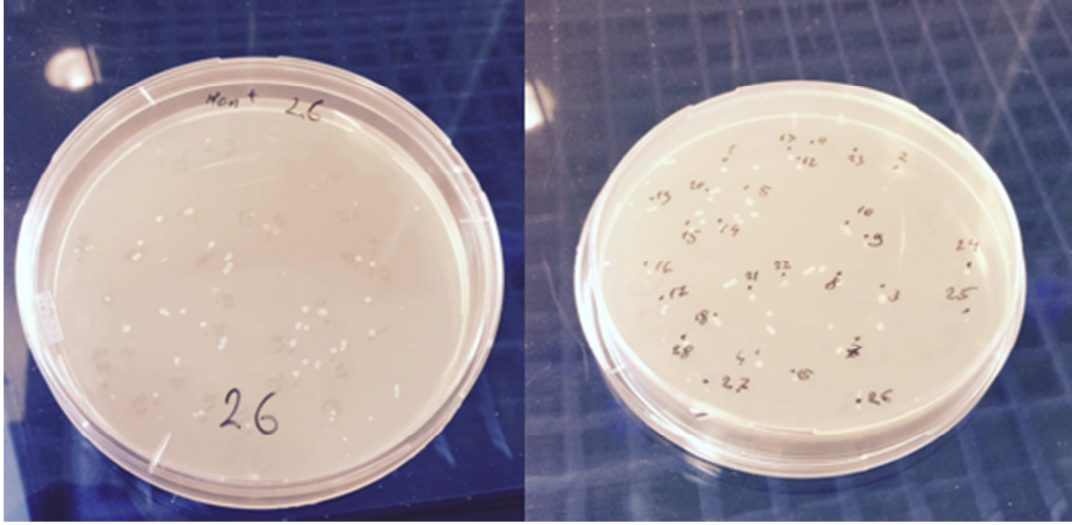
Elde edilen fragmentler; detayları metot kısmında verildiği üzere, bir dizi enzim kesim işlemine tabi tutulmuş ve hygromisin içeren plasmide klonlanmıştır. Higromycin direnç geninin her iki tarafında, hedef genin sağ ve solundaki DNA dizilerini (flanking region) içeren plasmid başarılı bir işlemle *E. coli* kompetent hücrelerine aktarılmıştır (Şekil 9).



Şekil 9. Kompetent *E. coli* hücrelerine sıcaklık şoku ile plasmid girişinin sağlanması

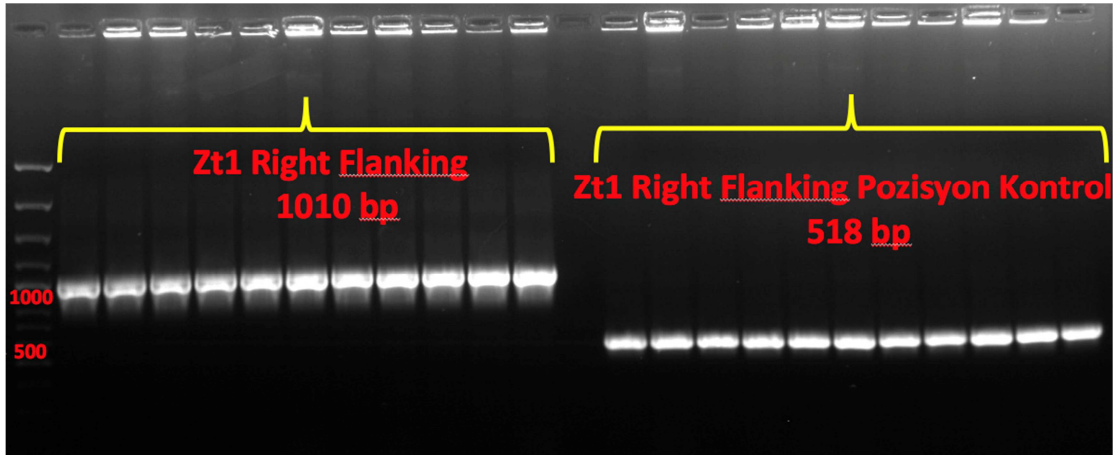
Transformasyonun ardından inkübasyona bırakılan Kan<sup>+</sup> petrilinde, insertleri içeren plasmidleri bünyesine başarılı bir şekilde alan *E. coli* hücreleri gelişebilirken, transforme olmayan hücreler ölmüştür. Nitekim kontrol petrilinde

herhangi bir gelişme olmamıştır. Gelişen kolonilere ait görüntü Şekil 10'da verilmiştir.



Şekil 10. Transformasyon sonrası Kanamisin direnci kazanmış *E.coli* kolonileri ve koloni PCR için kolonilerin numaralandırılması

Transformasyon işleminin doğruluğunu test etmek için gelişen koloniler ayrı ayrı olmak üzere koloni PCR işlemine tabi tutulmuştur. Yapılan koloni PCR işlemine ait sonuçlar Şekil 11'de görülmektedir.



Şekil 11. Transformasyon işlemi tamamlanan 87205 kodlu (Zt1) fungus geninin sağ yapışma (right flanking) bölgesine ait, klonlama işlemini ve klonlamanın pozisyonunu analiz etmek için yapılan koloni PCR sonuçları. Her bant aynı klonlama işleminde gelişen ayrı bir koloniden elde edilmiştir. 988 bp uzunluğundaki sonuçlar fragmentin tam olarak klonlanabildiğini, 496 bp uzunluğundaki fragment ise fragmentin doğru pozisyona klonlandığını göstermektedir.

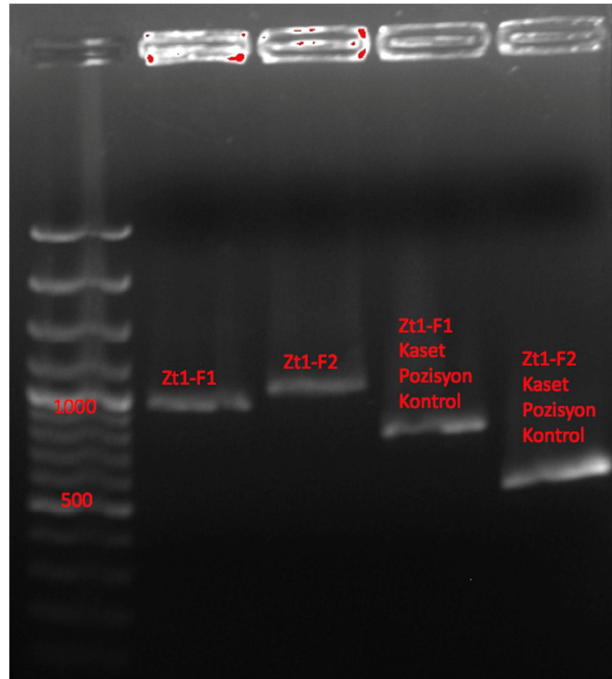
F1+Hyg+F2 olacak şekilde elde edilen gen silme kasetlerini içerdiği belirlenen plasmidler, *E. coli*'de çoğaltılarak saflaştırılmış ve *Agro* transformasyonunda kullanılmış. Metot kısmında detayları verilen transformasyon işlemi sonunda Kan<sup>+</sup> koloniler (transforme olmuş) oluşmuştur (Şekil 12).





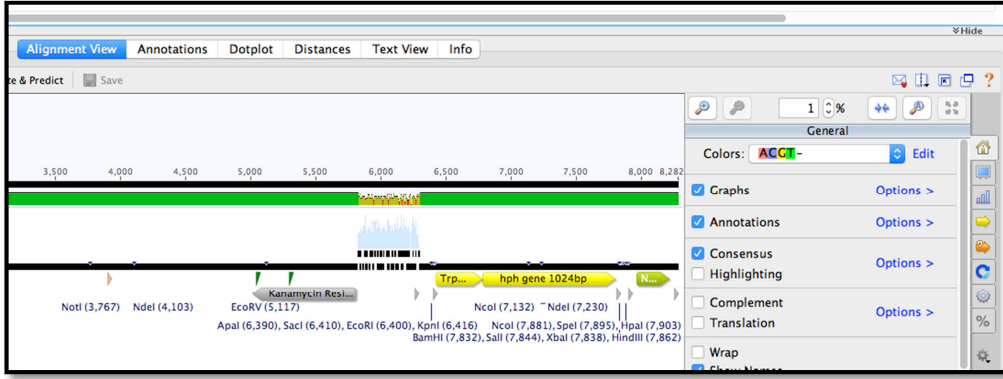
Şekil 12. Transform edilmiş Agrobacterium hücrelerinin inkübasyonu ve gelişen Kan<sup>+</sup> koloniler

Yine yapılan işlemin doğruluğunu test etmek için yapılan koloni PCR çalışmaları gen silme kasetlerinin doğru bir şekilde *Agrobacterium*'a aktarıldığını göstermektedir (Şekil 13).



Şekil 13. Zt1 genine ait gen silme kasetinin (Zt1F1+HYG+Zt1F2) *Agrobacterium*'a transformasyonu işleminin ardından gelişen kolonilerden, sol (F1) ve sağ (F2) yapışma bölgelerinin tam olarak ve doğru pozisyonda klonlandığını gösteren koloni PCR sonucu.

Koloni PCR çalışmasında pozitif sonuç alınan bazı genlere ait fragmentlerin sekans analizi ile pozisyon kontrolü yapılmıştır.

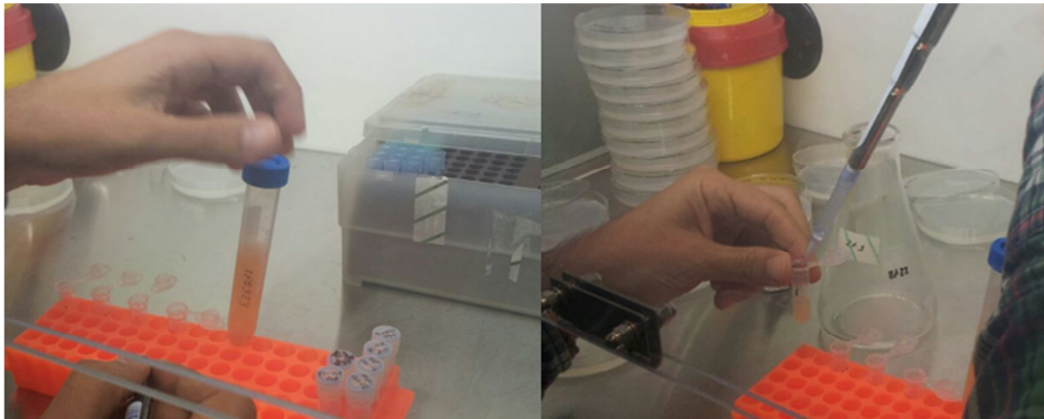


Şekil 14. Plasmid üzerinde Zt1\_F1 fragmentinin konumunun doğruluğu tespit etmek için gerçekleştirilen çıkıştırma işleminden bir görüntü. Fragmentin plasmid üzerindeki Kanamycin direnç geni ile Trp Promotör bölgesi arasına başarı ile klonlandığı görülmektedir.

Doğru pozisyonunda *Agrobacterium*'a klonlandığı belirlenen fragmentler için *Z. tritici*'nin *Agrobacterium* tarafından transformasyonu çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 15, 16, 17).



Şekil 15. Kurutma kağıtları arasında steril edilen selefon diskler ve bu disklerin IM:AS:Kan içeren petri kaplarına yayılışı



Şekil 16. Yoğunlukları daha önceden ayarlanmış *Z. tritici* ve *Agrobacterium* kültürlerinin bir araya getirilmesi



Şekil 17. Bir önceki aşamada hazırlanan karışımın selüloz membran üzerine yayılması ve bu şekilde hazırlanan petrilerin oda sıcaklığında inkübasyonu.

İki günlük inkübasyonun ardından selefon diskler, hazırlanan Aspergillus Minimal Medium: Timentin: Hygromisin petrilerine, steril koşullar altında aktarılmıştır. Bu aşamada Timentinin ortamdaki *Agrobacterium* hücrelerini, Hygromisinin de transforme olmayan *Z. tritici* sporlarını öldürmesi beklenmiştir. Yaklaşık 2 haftalık bir inkübasyonun ardından, beyaz pamuksu oluşumlar şeklinde ilk transformant *Z. tritici* kolonileri ortaya çıkmaya başlamıştır (Şekil 18)



Şekil 18. . Aspergillus Minimal Medium: Timentin: Hygromisin içeren petrilerde gelişmeye başlayan transforme olmuş *Z. tritici* kolonileri

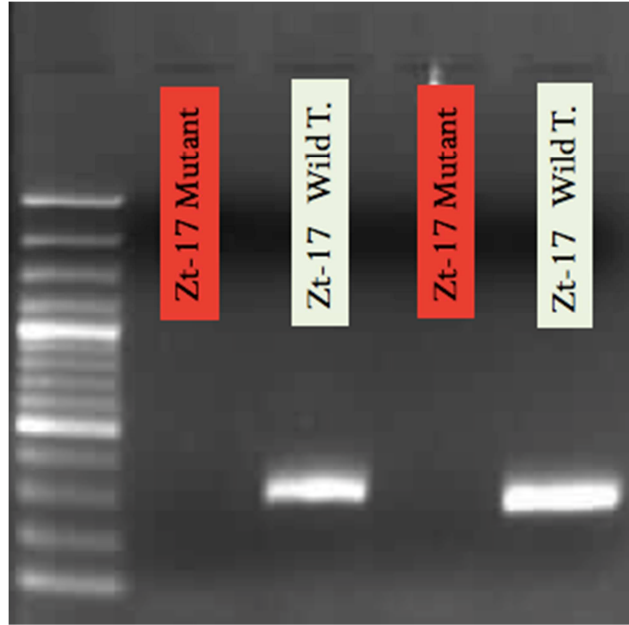
Gelişen her bir koloni bağımsız olarak Aspergillus Minimal Medium: Timentin: Hygromisin içeren petrilere 2-3 kez alt kültür yapılmış böylelikle sadece silinmek istenen genlere ait HYG kasetlerini içeren kültürlerin varlığından emin olunmuştur (Şekil 19).





Şekil 19. Transformasyonun doğrulanması için Aspergillus Minimal Medium: Timentin: Hygromisin petrilerinde tekrarlı alt kültüre alınan *Z. tritici* transformantları

Bu kasetlerin bir bütün olarak oluşan mutant izolatların genomları içerisinde olup olmadıklarını görebilmek için, kaset oluşturulmasında kullanılan primer setleri ile her bir gen için 2 adet kolonide PCR işlemi gerçekleştirilmiş ve kasedin başarı ile *Z. tritici* genomuna klonlandığı anlaşılmıştır (Şekil 20). Gen silme işlemi tamamlanan izolatlar %50 gliserol içerisinde -80'de muhafaza altına alınmıştır.

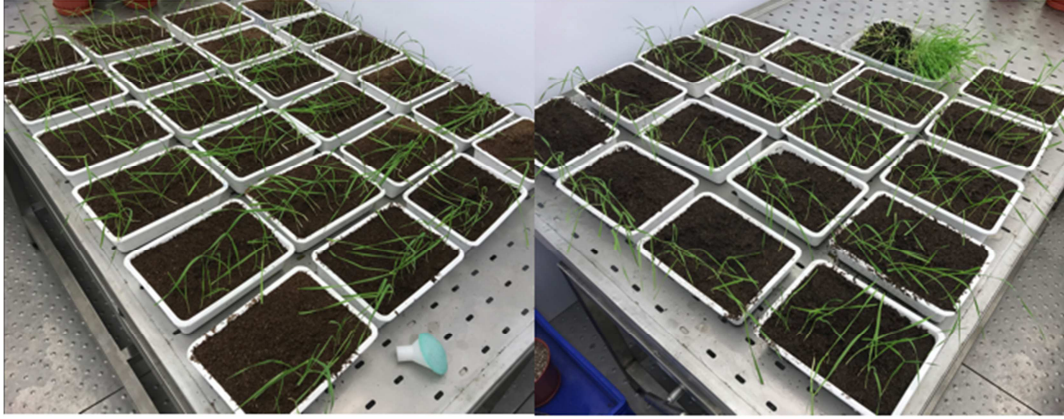


Şekil 20. Hedef genin silindiği izolatta (mutant) ve kontrol izolatında (wild type) gen silme işleminin doğrulanması. Gen silme işleminin başarı ile gerçekleştiği durumda herhangi bir PCR bandı oluşmamıştır.

*Agrobacterium*'a transformasyonu tamamlanan SSP genleri için yapılan *Z. tritici* transformasyonu çalışması sonunda, hedeflenen tüm genler için transforme olmuş koloniler elde edilebilmiştir.

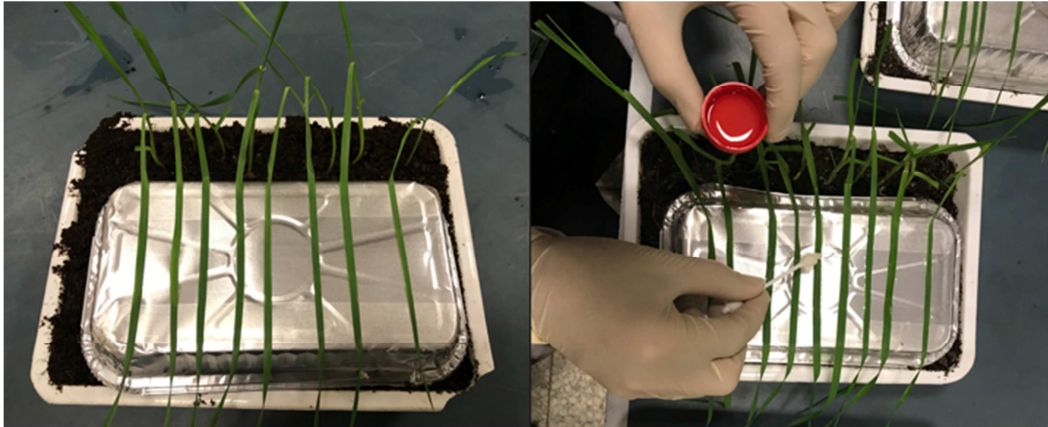
#### 4.2. Gen Silme İşleminin Fungusun Patojenik Karakterine Etkilerinin Belirlenmesi

Geni silme işleminin fungusun hastalandırma yeteneğine olan etkileri klasik patojenesite testleri ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla her gen için 4 tekerrür ve her tekerrürde 10 bitki olacak şekilde denemeler kurulmuştur (Şekil 21), 3 hafta boyunca bakım işlemleri uygulanmıştır.



Şekil 21. Patojenisite denemeleri için geliştirilen bitkiler

Geni silinmiş izolatlara ait spor süspansiyonlarının bulaştırılması için bitkiler metot kısmında detayları açıklandığı şekilde hazırlanmış ve bulaştırma deneyleri steril pamuklu çubuk yardımıyla gerçekleştirilmiştir (Şekil 22). Kontrol bitkilerine saf su ile muamele edilmiştir.

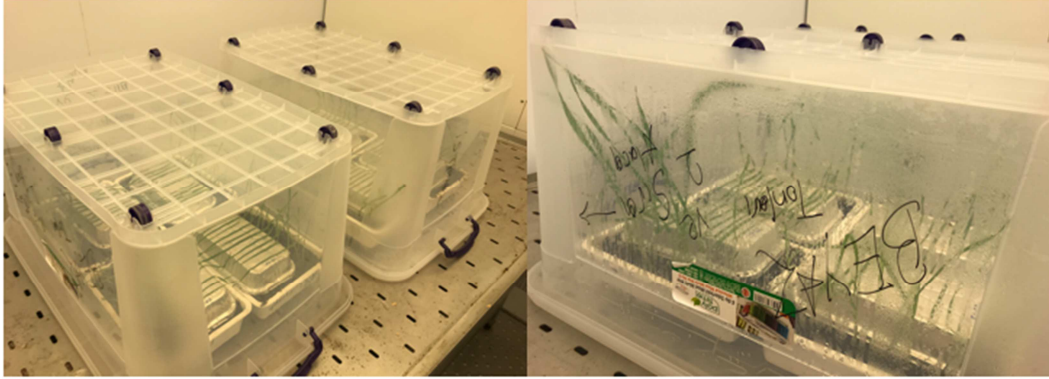


Şekil 22. Üç haftalık buğday bitkilerine geni silinmiş izolatların bulaştırılması

Bulaştırma işlemi gerçekleştirilen bitkiler her 4 tekerrür bir kabinde olacak şekilde plastik saklama kaplarında %100 nemde 3 gün süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

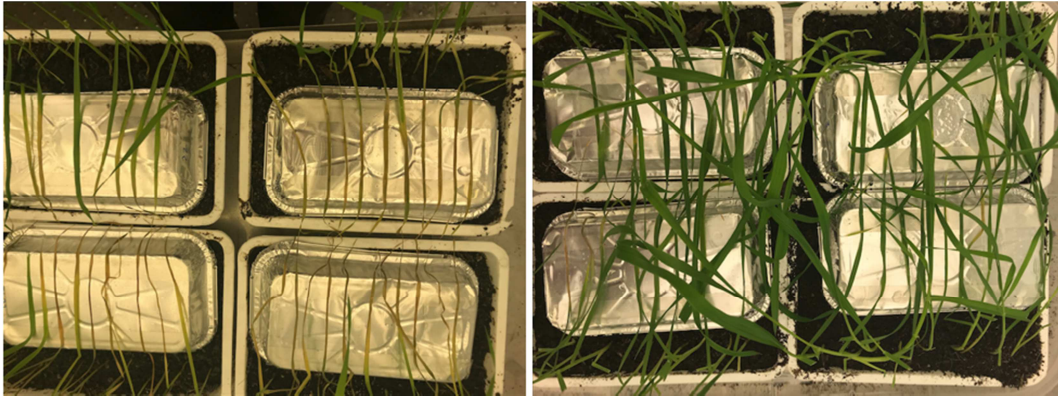


Kabın içerisine su doldurulması ve 12 saat arayla spreyleme yoluyla nemin muhafazası sağlanmıştır.



Şekil 23. Bulaştırmanın ardından nem çemberinde inkübasyona bırakılan bitkiler

Yaklaşık 10 günlük inkübasyonun ardından ilk nekrotik lekeler görülmeye başlanmış, 20 günlük inkübasyonun ardından uygulama yapılan tüm bitkiler ve IPO323 orijinal izolat (wild type) ile bulaştırılan bitkilerde tüm yaprak alanı kurumuştur (Şekil 23).



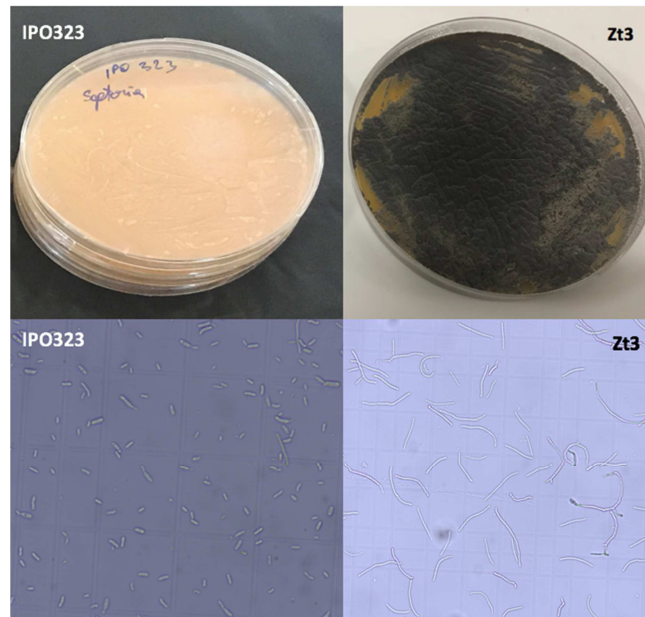
Şekil 24. Geni silinmiş izolatlar ile yapılan patojenisite testlerinden görüntü. Sol tarafta Zt1 genine ait denemede tamamen nekroze olmuş bitkiler görünmektedir. Sağ tarafta kontrol bitkileri yer almaktadır.

Yapılan testler SSP genleri silinmiş izolatların orijinal IPO323 izolatı ile aynı şiddette buğday bitkisini hastalandırdığını göstermiştir. Bu sonuçlar ışığında bu genlerin silinmesinin IPO323 izolatının hastalandırma yeteneğinde herhangi bir değişikliğe sebep olmamış, izolatlar yapılan varyans analiz testlerinde IPO323 ile aynı grupta yer almışlardır (Tablo 8).

Tablo 8. SSP genleri silinmiş izolatların oluşturduğu hastalık şiddeti değerlerine ait varyans analizi

GEN KODU	Hast Şiddeti (%)	İSTATİSTİKİ GRUP
Kontrol	16	A
IPO323	87	BC
87 205	85	BC
83 081	89	BC
104 444	77	B
79 286	81	BC
100 649	83	BC
104 383	85	BC
104 758	85	BC
105 826	87	BC
Ortalama	86	
Ö.D.	%5	

Yapılan analizlerde genel olarak seçilen SSP genlerinin silinmesinin *Z. tritici*'nin genomundan silinmesinin patojenin buğdayı hastalandırma yeteneği üzerinde istatistiki anlamda bir fark yaratmadığı görülmüştür. Zt3 kodlu (104444) SSP geninin silinmesinin hastalık şiddetinde az da olsa bir azalmaya sebep olduğu görülmektedir. Bu genin silinmesi fungusun mikropikniospor oluşturma yeteneği üzerinde ciddi bir fark oluşturmuş bu nedenle bulaştırma deneylerinde standart metotta  $1 \times 10^7$  spor konsantrasyonuna ulaşmak mümkün olmamış, en fazla  $1 \times 10^5$  spor yoğunluğuna ulaşılabilmiştir. Hastalık şiddetindeki küçük de olsa düşüşün bu sebepten kaynaklandığı düşünülmektedir. Yine Zt3'ün silinmesi IPO323'ün koloni morfolojisi üzerinde de fark yaratmış, koloni rengini değiştirmiştir (Şekil 25)



Şekil 25. IPO323'ün genomundan silinen Zt3 (104444)'ün silinmesinin ardından *Z. tritici* koloni morfolojisinde meydana gelen değişimler. Koloni rengi değişmiş ve mikropikniospor oluşumu engellenmiştir.



104444 kodlu genin silinmesi ile oluşan durumun farklı koşullar altında farklı gelişme formlarına sahip bu fungusta, fungusun biyolojisi ve epidemiyolojisi açısından ciddi sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir.

## 5. TARTIŞMA

Septorya Yaprak Lekesi etmeni *Zymoseptoria tritici* günümüzde Avrupa'da buğday alanlarında sorun olan en önemli yaprak hastalığı konumundadır Fones and Gurr (2015). Bazı sezonlarda %50'ye varan verim kayıplarına neden olduğuna ve Avrupa'daki yıllık fungusit uygulamalarının %70'inin bu fungusu kontrol altına almak için yapıldığına dair kayıtlar mevcuttur (Solomon, 2017). Ülkemizde de bazı yıllarda, buğday üretim alanlarında hastalık gelişimi için uygun koşullar oluştuğunda önemli oranda gelişim gösterebilmektedir (Ölmez, 2011; Turgay, 2016).

Aynı cins içerisine giren ve *Z. tritici*'ye çok yakın bir tür olan *Parastagonospora nodorum*'da infeksiyon mekanizmaları ile ilgili birçok konu aydınlatılmış olmasına rağmen, *Z. tritici*'de fungusun bitkiyi nasıl hastalandırdığı, bu süreçte rol oynayan moleküler mekanizmaların neler olduğu konusu halen gizemini korumaktadır (Solomon, 2017). Genel olarak ise fungusun infeksiyon döngüsüne serin ve nemli ortamlarda yaprak yüzeyinde çimlenen sporların stomalardan bitkiye giriş yapması ile başladığı bilinmektedir (Steinberg, 2015). Patojenin biyolojisi ile ilgili bu temel verilere rağmen, fungusun tam genom sekansının yayınlanması (Goodwin vd., 2011) ve bir dizi biyoinformatik analizin yapılmasının ardından *Z. tritici* genomunda 171 adet 200 amino asitten küçük gen olduğu belirtilmiştir (do Amaral vd., 2012). Aynı çalışmada diğer birçok fitopatojenik fungusun aksine *Z. tritici* genomunda hücre duvarını yıkan enzimleri kodlayan çok az sayıda gen olduğu; bu yönüyle fungusun bir patojenden çok endofit funguslara benzediği belirtilmiştir.

*Z. tritici* gibi ölü ya da ölmekte olan dokular üzerinde beslenen nekrotrofik mikroorganizmalarla bitkilerin nasıl mücadele ettiği hakkında çok az şey bilinmektedir. Geçmişte nekrotrofların bir dizi hücre duvarı yıkan enzim sayesinde konukçusunun hücre duvarını parçalayıp oradan beslendiği düşünülmekteydi. Fakat yapılan yeni çalışmalar (Faris vd., 2010) durumun sanılandan daha kompleks olduğunu, bu tip organizmalar tarafından salınan bazı nekrotrofik efektörlerin konukçu hücresi tarafından tanınmasının, konukçuda programlanmış hücre ölümünü tetiklediği, böylelikle patojenin beslenmesi ve sporulasyonu için uygun ortamın oluştuğunu ortaya koymuştur. Tam da bu nedenle *Zymoseptoria* buğday moleküler interaksiyonlarının iyi anlaşılması fungusa karşı mücadele

stratejilerinin geliştirilmesinde ve dayanıklılık ıslahı çalışmalarının programlanmasında büyük önem arz etmektedir. Çünkü bir fitopatojenik fungusun bitkideki dayanıklılık mekanizmasını bloke eden efektör proteinlere sahip olması durumunda, dayanıklılık ıslahı çalışmaları çok daha kompleks bir hal almaktadır. Böylesi durumlarda, bir çeşidi dayanıklı hale getirmek için ilgili dayanıklılık geninin bitkiye aktarılması yetmemekte, fungal efektör ile etkileşime geçerek bitkide hassasiyete neden olan “hassasiyet geni (susceptibility gene)”nin de bitkiden uzaklaştırılması, ıslah programının bu doğrultuda hazırlanması gerekmektedir. Yakın zamanda yapılan bir dizi çalışmada (Shi vd., 2016), buğdayda hastalık oluşturan bir diğer Septorya türü olan *P. nodorum*'da hem nekrotrofik efektör kodlayan gen hem de bu efektörü tanıyarak buğdayın hastalanmasına yol açan hassasiyet geni başarı ile belirlenmiştir.

Ülkemiz için gün geçtikçe önemini arttıran bu fungal hastalık için dünyada yapılan çalışmaların önemli bir bölümü fungusun genomundaki efektör proteinleri kodlayan, fungusun biyolojisinde rol alan kritik süreçleri yöneten genlerin belirlenmesi üzerine odaklanmıştır. Bu amaçla kullanılan teknolojilerin başında da hedef genin fonksiyonlarının genin canlının genomundan tamamen silindiği “gen silme (gene knock out) tekniği” gelmektedir. Burada optimize edilen bu teknoloji ülkemizde bu fungusta ilk defa uygulamaya konulmuş ve hedeflenen genlerin tamamı fungusun genomundan silinebilmiştir. Bu fungusta dünyada farklı araştırma grupları da aynı tekniği kullanarak gen fonksiyonlarını belirlemeye çalışmaktadırlar (Mirzadi Gohari vd., 2014; Zhong vd., 2017).

Ektopik transformasyon, funguslarda gen fonksiyonu çalışmalarında sık görülen problemlerdendir. Gen silme işlemi için hazırlanan kasedin hedef bölge dışındaki bir bölgeye entegrasyonu bu olayın başlıca sebebidir. “Homolog olmayan uca eklenme (Non-homologous end joining-NHEJ)” olarak adlandırılan olay bilinen canlıların tamamında en sık kullanılan DNA tamir mekanizmalarından birisidir ve kırık DNA uçlarının birleştirilmesinde yüksek oranda **homoloji göstermeyen** ipliklerin birleştirilmesi esasına dayanır. Ökaryotlarda bu biyolojik süreçte bir çok protein rol almaktadır. Bu proteinleri kodlayan genlerin başında *Z. tritici* genomunda *Ku70* ve *Ku80* genleri gelmektedir. Fungusların birçoğunda da bu genlerin homologları mevcuttur. Bu genlerin varlığında ve aktif çalıştıkları durumda, gen silme kasedinin her iki tarafında yer alan ve hedef genin 5' ve 3' tarafı ile (left and right flanking region) çok yüksek homoloji gösteren dizilerin bir anlamı olmamakta, hazırlanan kaset NHEJ tamir mekanizması yüzünden, genom üzerinde çok düşük homoloji gösteren yerlere dahi entegre olabilmektedir. Bu durum ektopik transformasyonların oluşması ve transformasyonun etkinliğinin

çok önemli oranda düşmesi ile sonuçlanmaktadır. Bu çalışmada kullanılan *Z. tritici* orijinal izolatı (IPO323) da *Ku70* ve *Ku80* genlerini içermektedir. Bu izolatin transformasyon etkinliğini arttırmak için bu genlerin susturulması yoluyla elde edilmiş mutant izolatlar geliştirilmiştir (Sidhu vd., 2015). Araştırmacılar *Ku* genleri silinmiş izolat (*Ku* null mutant) kullanarak yaptıkları çalışmada patojenisitede bir değişikliğe neden olunmadan, transformasyon etkinliğinin %85 oranında artırıldığını rapor etmişlerdir. İlgili strain, bu izolatları geliştiren ekipten istenmesine rağmen, mutant izolatları geliştiren ekip paylaşmayı uygun görmemiştir. Bu nedenle burada tarafımızdan yürütülen çalışmada NHEJ sistemi aktif olarak çalışan IPO323 izolatı kullanılmak durumunda kalınmış, bu da ektopik transformasyonların sıkça gerçekleşmesi nedeniyle tekrarlı çalışmaların yapılması gerekliliği ile sonuçlanmıştır. *Neurospora crassa* (Ninomiya vd., 2004), *Stagonospora nodorum* (Feng vd., 2012) ve *Magnaporthe grisea* (Kershaw ve Talbot, 2009) gibi bazı askomiset funguslarda olduğu gibi, *Z. tritici*'de de gen hedeflenmesi yoluyla fonksiyon analizi çalışmalarının zor ve etkinliğinin düşük olduğu belirtilmiştir (Bowler vd., 2010). Araştırmacılar bu durumun hedef genin kromozomal lokasyonu, kromatin yapısı ve hedef genin transkripsiyon evresinden kaynaklanabileceğinden bahsetmişlerdir. Burada elde edilen ektopik transformasyon ile sonuçlanan deneylerin de, NHEJ mekanizması yanında, bu tip sorunların bir ya da birkaçından kaynaklanmış olabileceği değerlendirilmektedir.

*Z. tritici* dimorfik bir fungustur; yani fungus farklı sıcaklık ve çevre koşullarında maya formu ve miselial form arasında geçişler yapmaktadır. Maya formu fungusun bol miktarda spor üreterek buğday yaprağı üzerinde yayılmasında, miselial formu ise sporun çimlenerek stomalardan bitkiye girişinde çok büyük öneme sahiptir. Dolayısı ile bu özellik fungusun patojenik döngüsünde çok kritiktir. Fungusun genomunda, normal biyolojik gelişim sürecinde bu iki evreden hangisinin seçileceğine karar verilmesinde rol alan genlerin belirlenmesi için Yemelin ve ark., (2017) tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışma, *Z. tritici* genomundan silinmeleri durumunda maya formunun oluşmasını engelleyen iki adet genin varlığını ortaya koymuştur. Tarafımızdan yapılan çalışmada da Zt3 kodlu (104444) genin silinmesinin fungusun maya formu oluşturmasını engellediği ve normalde maya formunda yaşadığı sıcaklıklarda mikro pikniospor üretiminin çok önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir; bunun yerine fungus makropikniospor üretmeyi tercih etmiştir. Mohammadi vd. (2017), tarafından yine çok yakın zamanda yapılan bir çalışmada benzer sonuçları olan gen silme çalışmaları yapmışlardır. Araştırmacılar fungusun genomunda bir adet kopyası bulunan fungal transkripsiyon faktörünü kodlayan ZtVf1 genini gen silme tekniği ile başarı ile silmişler ve bu silme işleminin fungusun infeksiyonun ardından buğday





yaprağı üzerinde piknit oluşturma yeteneğini çok önemli ölçüde azattığını ortaya koymuşlardır. Üretilen ve salınan spor miktarı özellikle Septoria gibi yağmur damlaları ile üst yapraklara taşınan bir fungus için büyük önem arz etmektedir. Her ne kadar Fones ve ark. (2015), yaptıkları çalışmada çok düşük spor yoğunluklarında bile başarılı bir infeksiyonun gerçekleşebileceğini göstermiş olsalar da, aynı makalelerinde doğal koşulların yapay inokulasyon koşulları gibi optimum şartları taşımayacağını ve doğadaki durumun çok daha farklı olabileceğini ifade etmişlerdir.

Bu çalışma kapsamında seçilen, bugüne kadar olası fonksiyonları hakkında herhangi bir anotasyon yapılmamış olan SSP genleri için elde ettiğimiz bu sonuçların fungusun biyolojisinin daha iyi anlaşılmasında önemli bir rol alacağını düşünmekteyiz. Bu durumun ortaya çıkmasına neden olan moleküler etkileşimlerin daha sonra yapılacak çalışmalarla protein-protein interaksiyonları düzeyinde aydınlatılması, fungusla mücadelede yeni mücadele stratejilerinin ve kimyasalların geliştirilmesi açısından büyük önem arz edecektir.

## KAYNAKLAR

- Arraiano, L. ve Brown, J. (2006). Identification of isolate-specific and partial resistance to septoria tritici blotch in 238 European wheat cultivars and breeding lines. *Plant Pathology*, 55(6), 726-738.
- Bowler, J., Scott, E., Tailor, R., Scalliet, G., Ray, J. ve Csukai, M. (2010). New capabilities for Mycosphaerella graminicola research. *Molecular plant pathology*, 11(5), 691-704.
- Brown, J. K., Chartrain, L., Lasserre-Zuber, P. ve Saintenac, C. (2015). Genetics of resistance to Zymoseptoria tritici and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 33-41.
- De Jonge, R. ve Thomma, B. P. (2009). Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity? *Trends in microbiology*, 17(4), 151-157.
- de Wit, P. J. (2007). How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(21), 2726-2732.
- do Amaral, A. M., Antoniow, J., Rudd, J. J. ve Hammond-Kosack, K. E. (2012). Defining the predicted protein secretome of the fungal wheat leaf pathogen Mycosphaerella graminicola. *PLoS One*, 7(12), e49904.
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants *Molecular techniques in taxonomy* (pp. 283-293): Springer.
- Faris, J. D., Zhang, Z., Lu, H., Lu, S., Reddy, L., Cloutier, S. ve diğ., Xu, S. S. (2010). A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(30), 13544-13549.
- Feng, J., Li, W., Hwang, S.-F., Gossen, B. D. ve Strelkov, S. E. (2012). Enhanced gene replacement frequency in KU70 disruption strain of Stagonospora nodorum. *Microbiological research*, 167(3), 173-178.
- Flor, H. (1942). Inheritance of pathogenicity in Melampsora lini. *Phytopathology*, 32, 653-669.
- Fones, H. ve Gurr, S. (2015). The impact of Septoria tritici Blotch disease on wheat: An EU perspective. *Fungal Genetics and Biology*, 79(Supplement C), 3-7. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.04.004>
- Goodwin, S. B., M'barek, S. B., Dhillon, B., Wittenberg, A. H., Crane, C. F., Hane, J. K. ve diğ., Aerts, A. (2011). Finished genome of the fungal wheat pathogen Mycosphaerella graminicola reveals dispensome structure, chromosome plasticity, and stealth pathogenesis. *PLoS Genetics*, 7(6), e1002070.
- Hammond-Kosack, K. E. ve Rudd, J. J. (2008). Plant resistance signalling hijacked by a necrotrophic fungal pathogen. *Plant signaling & behavior*, 3(11), 993-995.
- Jones, J. D. ve Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K. ve diğ., Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor.



*Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(29), 11086-11091.

- Kellner, R., Bhattacharyya, A., Poppe, S., Hsu, T. Y., Brem, R. B. ve Stukenbrock, E. H. (2014). Expression profiling of the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici* reveals genomic patterns of transcription and host-specific regulatory programs. *Genome biology and evolution*, 6(6), 1353-1365.
- Kema, G., Koeken, J. ve Verstappen, E. (1997). *Avirulence in Mycosphaerella graminicola (anamorph Septoria tritici) is controlled by a complex locus of tightly linked genes*. Paper presented at the Poster, Abstract 19th Fungal Genetics Conference, Asilomar, Usa, 18-13 March.
- Kershaw, M. J. ve Talbot, N. J. (2009). Genome-wide functional analysis reveals that infection-associated fungal autophagy is necessary for rice blast disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37), 15967-15972.
- Marshall, R., Kombrink, A., Motteram, J., Loza-Reyes, E., Lucas, J., Hammond-Kosack, K. E.ve diğ., .Rudd, J. J. (2011). Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat. *Plant physiology*, 156(2), 756-769.
- Mirzadi Gohari, A., Mehrabi, R., Robert, O., Ince, I. A., Boeren, S., Schuster, M.ve diğ., .Kema, G. H. (2014). Molecular characterization and functional analyses of ZtWor1, a transcriptional regulator of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Molecular plant pathology*, 15(4), 394-405.
- Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K.ve diğ., .Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19613-19618.
- Mohammadi, N., Mehrabi, R., Gohari, A. M., Goltapeh, E. M., Safaie, N. ve Kema, G. H. (2017). The ZtVf1 transcription factor regulates development and virulence in the foliar wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology*, 109, 26-35.
- Motteram, J., Küfner, I., Deller, S., Brunner, F., Hammond-Kosack, K. E., Nürnberger, T. ve Rudd, J. J. (2009). Molecular characterization and functional analysis of MgNLP, the sole NPP1 domain-containing protein, from the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(7), 790-799.
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C. ve Inoue, H. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(33), 12248-12253.
- Ölmez, F., S. Öztürk Tantekin, B. Kansu, B. Tunalı. (2011). *Septoria Diseases on Wheat at Southeast Anatolia, Turkey*.
- Palma-Guerrero, J., Ma, X., Torriani, S. F., Zala, M., Francisco, C. S., Hartmann, F. E.ve diğ., .McDonald, B. A. (2017). Comparative transcriptome analyses in *Zymoseptoria tritici* reveal significant differences in gene expression among strains during plant infection. *Molecular plant-microbe interactions*, 30(3), 231-244.
- Rudd, J. J., Kanyuka, K., Hassani-Pak, K., Derbyshire, M., Andongabo, A., Devonshire, J.ve diğ., .Powers, S. J. (2015). Transcriptome and metabolite profiling of the infection cycle of *Zymoseptoria tritici* on wheat

- reveals a biphasic interaction with plant immunity involving differential pathogen chromosomal contributions and a variation on the hemibiotrophic lifestyle definition. *Plant physiology*, 167(3), 1158-1185.
- Saintenac, C., Lee, W.-S., Cambon, F., Rudd, J. J., King, R. C., Marande, W.ve diğ., .Kanyuka, K. (2018). Wheat receptor-kinase-like protein Stb6 controls gene-for-gene resistance to fungal pathogen *Zymoseptoria tritici*. *Nature Genetics*. doi: 10.1038/s41588-018-0051-x
- Sánchez-Vallet, A., McDonald, M. C., Solomon, P. S. ve McDonald, B. A. (2015). Is *Zymoseptoria tritici* a hemibiotroph? *Fungal Genetics and Biology*, 79, 29-32.
- Shan, W., Cao, M., Leung, D. ve Tyler, B. M. (2004). The Avr1b locus of *Phytophthora sojae* encodes an elicitor and a regulator required for avirulence on soybean plants carrying resistance gene Rps 1b. *Molecular plant-microbe interactions*, 17(4), 394-403.
- Shi, G., Zhang, Z., Friesen, T. L., Raats, D., Fahima, T., Brueggeman, R. S.ve diğ., .Chao, W. (2016). The hijacking of a receptor kinase-driven pathway by a wheat fungal pathogen leads to disease. *Science advances*, 2(10), e1600822.
- Sidhu, Y., Cairns, T., Chaudhari, Y., Usher, J., Talbot, N., Studholme, D.ve diğ., .Haynes, K. (2015). Exploitation of sulfonylurea resistance marker and non-homologous end joining mutants for functional analysis in *Zymoseptoria tritici*. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 102-109.
- Solomon, P. S. (2017). Have we finally opened the door to understanding *Septoria tritici* blotch disease in wheat? *New Phytologist*, 214(2), 493-495.
- Steinberg, G. (2015). Cell biology of *Zymoseptoria tritici*: Pathogen cell organization and wheat infection. *Fungal Genetics and Biology*, 79, 17-23.
- Turgay, E., Büyük, O., Ölmez, F., Yıldırım, AF, Mert, Z. (2016). Determination of prevalence of the *Septoria* leaf blotch disease of wheat [*Zymoseptoria tritici* (Desm. Quaedvlieg & Crous)] in Central Anatolia and its molecular identification. *Bitki Koruma Bülteni*, 56(3), 283-293.
- van Kan, J. A., Van den Ackerveken, G. ve De Wit, P. (1991). Cloning and characterization of cDNA of avirulence gene avr9 of the fungal pathogen *Cladosporium fulvum*, causal agent of tomato leaf mold. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 4, 52-59.
- Yemelin, A., Brauchler, A., Jacob, S., Laufer, J., Heck, L., Foster, A. J.ve diğ., .Thines, E. (2017). Identification of factors involved in dimorphism and pathogenicity of *Zymoseptoria tritici*. *PLoS One*, 12(8), e0183065.
- Zhong, Z., Marcel, T. C., Hartmann, F. E., Ma, X., Plissonneau, C., Zala, M.ve diğ., .Lapalu, N. (2017). A small secreted protein in *Zymoseptoria tritici* is responsible for avirulence on wheat cultivars carrying the Stb6 resistance gene. *New Phytologist*, 214(2), 619-631.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Dr. FATİH ÖLMEZ
Proje No:	114O083
Proje Başlığı:	Buğdayda Sorun Olan Septorya Yaprak Lekesi (Zymoseptoria tritici) Patojeni'nde Fungal Efektör Adayı Bazı SSP (Small Secreted Protein) Genlerinin Fonksiyonel Analizi
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	BERNA TUNALI
Danışmanlar:	JASON RUDD (Yurt Dışı)
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	GIDA, TARIM VE HAYVANCILIK BAKANLIĞI - TARLA BİTKİLERİ MERKEZ ARAŞTIRMA ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ - ANKARA
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/06/2014 - 15/12/2017
Onaylanan Bütçe:	358005.0
Harcanan Bütçe:	329974.26
Öz:	<p>Septorya yaprak leke hastalığı etmeni Zymoseptoria tritici ülkemizde buğdayın en önemli yaprak hastalıklarından birisidir. Askomiset, hemibiotrof bir fungus olan fungusun tam genom sekans analizleri tamamlanmış ve erişime açılmıştır. Fungusun genomundaki genlerin fonksiyonlarının ve bitkiyi hastalandırma sürecinde görev alan efektor genlerinin belirlenmesi fungusa karşı mücadele stratejilerinin geliştirilmesinde büyük önem arz etmektedir.</p> <p>Bu proje buğday yaprak lekesi etmeni Z. tritici genomunda yer alan bazı küçük, hücre arasına salınan proteinleri kodlayan, fungal efektor aday genlerin (Small Secreted Protein- SSP) gen silme tekniği ile fungusun genomundan silinip, fungusun biyolojik ve patolojik özelliklerine etkilerinin belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Hedef SSP genlerine ait nükleotid dizileri kullanılarak oluşturulan gen silme kasetleri ve Agrobacterium temelli transformasyon tekniği kullanılarak patojenin genomundan hedeflenen genlerin tamamı silinebilmiştir.</p> <p>Silinen SSP genlerinden biri (Zt-3) fungusun temel biyolojik özelliklerinden biri olan maya formunda gelişim özelliğini önemli oranda etkilemiştir. Zt-3 geni silinmiş izolat sadece makro piknidiospor üretebilmiştir. Çalışılan genlerin fungusun hastalandırma yeteneği üzerinde etkili olup olmadığı, geni silinmiş izolatlar ile yapılan patojenisite testleri ile araştırılmıştır. Herhangi bir etki bulunamamıştır.</p> <p>Çalışma sonunda Z. tritici gen fonksiyonu çalışmalarında gen silme tekniği ülkemizde ilk defa kullanılmış ve optimize edilmiştir. Yapılan çalışma bu tekniğin fungal genlerin fonksiyonlarının belirlenmesinde başarılı ve etkin bir şekilde kullanılabileceğini ortaya koymuştur.</p>
Anahtar Kelimeler:	Buğday, Yaprak Leke Hastalığı, Fungal Efektör, SSP, Gen Silme
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır